
BACHELORARBEIT

Frau
Nadine Wappler

**Untersuchung der differentiellen
Expression Gen-assoziiierter
endogener Retroviren
und des Gens CYP4Z1 in
Hodgkin-Lymphom-Zellen**

Mittweida, 2012

BACHELORARBEIT

Untersuchung der differentiellen Expression Gen-assoziiierter endogener Retroviren und des Gens CYP4Z1 in Hodgkin-Lymphom-Zellen

Autor:

Frau

Nadine Wappler

Studiengang:

Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:

BI09w2-B

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:

PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S.Staege

Einreichung:

Mittweida, 31.08.2012

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2012

Bibliografische Beschreibung:

Wappler, Nadine: Untersuchung der differentiellen Expression Gen-assoziiierter endogener Retroviren und des Gens CYP4Z1 in Hodgkin-Lymphom-Zellen. - 2012. – 15 Seiten Verzeichnisse, 72 Seiten Inhalt, 5 Seiten Anhang. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, 2012

Englischer Titel:

Analysis of differential expression of gen associated endogenous retroviruses and the gene CYP4Z1 in cells of Hodgkin lymphoma

Kurzbeschreibung:

Aufbauend auf vorangegangenen Untersuchungen zur differentiellen Expression von Transkripten in Zellen des Hodgkin-Lymphoms wird in dieser Arbeit die Expression von Gen-assoziierten HERV-Transkripten untersucht. Weiterhin soll der Einfluss von Östrogen auf die Expression überprüft werden. Dabei sollen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien sowie lymphoblastoide Zellen als Untersuchungsmaterial dienen. Als Vergleichsbasis werden Zellen des peripheren Blutes eingesetzt. Außerdem soll speziell die Funktion des Gens CYP4Z1 in Hodgkin-Lymphom-Zellen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meines Studiums und der Anfertigung dieser Abschlussarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer am Landeszentrum für Zell- und Gentherapie des Universitätsklinikums in Halle (Saale), Herrn PD Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit. Vielen Dank für die Geduld und das immer offene Ohr.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbke Wünschiers für die Übernahme der Betreuung an der Hochschule Mittweida.

Weiterhin möchte ich mich recht herzlich bei Ines Volkmer und Stefanie Kewitz sowie Beate Meinhardt für die Unterstützung im Labor und die interessanten Gespräche bedanken.

Ich danke außerdem Herrn Marco Rost für seine Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses und die Korrektur dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich bei meinen Eltern und meinem Bruder Marcel für die liebevolle Pflege während meiner Krankheit und die stetige Unterstützung und den Beistand während meines Studiums bedanken. Ohne sie wäre mir dieses Studium nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Humane endogene Retroviren (HERVs)	2
1.1.1 HERVs allgemein	2
1.1.2 Funktionen von HERVs im Organismus	2
1.1.3 Einfluss endogener Retroviren auf die Tumorphagenese	3
1.2 Aufbau und Funktion des Gens CYP4Z1	3
1.3 Chromosomeninstabilitätssyndrome	4
1.3.1 Fanconi-Anämie	5
1.3.2 Bloom-Syndrom	5
1.4 Zelltypen	6
1.4.1 Zellen des Hodgkin-Lymphoms	6
1.4.2 Peripheres Blut (PBMCs)	7
1.4.3 Lymphoblastoide Zellen	7
1.5 Erkenntnisse vorangegangener Arbeiten	8
2 Zielstellung	10
3 Material	11
3.1 Chemikalien	11
3.2 Medien und Puffer	11
3.3 Zelllinien und Bakterienstämme	12
3.4 Enzyme, Fertige Lösungen und Reaktionskits	13
3.5 Primer und miR RNAi	14
3.6 Vektoren	16
3.7 Geräte	17
4 Methoden	18

4.1 Zellkultur	18
4.2 RNA-Extraktion	18
4.3 Reverse Transkription (cDNA Synthese)	19
4.4 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	20
4.4.1 Real-Time PCR	20
4.4.2 Standard PCR	21
4.4.3 Sequenzier-PCR	21
4.4.4 SMART-PCR	22
4.4.4.1 Erststrangsynthese	22
4.4.4.2 PCR	23
4.5 Gelelektrophorese	23
4.6 Gelextraktion	24
4.7 Fällung der Sequenzier-PCR	24
4.8 Gen-Knockdown in L-428-Zellen	24
4.8.1 Design und Hybridisierung der siRNA	25
4.8.2 Klonierung in den miR-Vektor	25
4.8.3 Transformation in <i>E. coli</i>	26
4.8.4 Anzüchtung der Plasmide	26
4.8.5 Plasmidisolierung	26
4.8.6 Transfektion der Plasmid-DNA in L-428-Zellen	27
4.8.7 FACS-Analyse	27
5 Ergebnisse	28
5.1 Nachweis der Expression von HERV-Transkripten	28
5.1.1 PCR mit Primern für die HERV-Familie HERV-H	28
5.1.2 Nachweis ausgewählter Gen-assoziiierter HERV-Familien	28
5.1.3 Nachweis der Expression von spezifischen HERV-Transkripten innerhalb der HERV-Region einzelner Gene	29
5.1.4 Real-Time-PCR der Gen-assoziierten HERVs	31

5.1.4.1 CYP4Z1-assoziierte HERVs	31
5.1.4.2 FANCD2-assoziiertes HERV	32
5.1.4.3 BLM-assoziiertes HERV	33
5.1.4.4 DKC1-assoziiertes HERV	33
5.1.4.5 TRIM24-assoziiertes HERV	34
5.2 Sequenzierung Gen-assoziiierter HERVs	34
5.3 Auswirkung von Östrogen auf die Expression von HERV-Transkripten	34
5.3.1 Expression von HERV-Transkripten in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien nach Östrogenzugabe	35
5.3.1.1 L-428	35
5.3.1.2 L-1236	36
5.3.1.3 L-540	37
5.3.1.4 KM-H2	37
5.3.1.5 HDLM-2	38
5.3.2 Expression von HERV-Transkripten in lymphoblastoiden Zelllinien nach Östrogenzugabe	38
5.3.2.1 EREB2-5	38
5.3.2.2 A2+2310	39
5.4 Auswirkung von Östrogen auf die Expression von Gen-Transkripten in ausgewählten Zelllinien	40
5.4.1 Expression von Gen-Transkripten in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien nach Östrogenzugabe	41
5.4.1.1 L-428	41
5.4.1.2 L-1236	41
5.4.1.3 L-540	42
5.4.1.4 KM-H2	42
5.4.1.5 HDLM-2	43
5.4.2 Expression von Gen-Transkripten in lymphoblastoiden Zelllinien nach Östrogenzugabe	44

5.4.2.1 EREB2-5	44
5.4.2.2 A2+2310	44
5.5 Analysen des Gens CYP4Z1	46
5.5.1 Probe Set-Expression von CYP4Z1	46
5.5.2 Bestimmung des Transkriptionsstartes von CYP4Z1	48
5.5.2.1 SMART-PCR	48
5.5.2.2 PCR mit Transkript-spezifischen Primern	49
5.5.3 Nachweis der Expression des Pseudogens von CYP4Z1 (CYP4Z2P)	50
5.5.4 Vergleich der Sequenzen von CYP4Z1 mit GeneDoc	51
5.5.5 Gene korrelierender Expression zu CYP4Z1	56
5.5.6 Knockdown von CYP4Z1 in L-428	57
5.5.6.1 Beurteilung des Transfektionserfolges mittels Fluoreszenzmikroskopie	57
5.5.6.2 Auswertung des Transfektionsergebnisses mittels FACS-Analyse	58
5.5.6.3 Real-Time PCR nach Knockdown von CYP4Z1 in L-428	59
6 Diskussion	62
6.1 Expression von HERV-Transkripten in Hodgkin-Lymphomzellen	62
6.2 Untersuchung der Expression des Gens CYP4Z1 in Hodgkin-Lymphom-Zellen	64
7 Ausblick	70
8 Zusammenfassung	71
9 Summary	72
Literaturverzeichnis	XI
Anhang	
Selbständigkeitserklärung	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Cytochrom P450, Subfamilie Z, Polypeptid 1 (<i>SWISS-Model</i>).	4
Abbildung 2: Sternberg-Reed-Zellen des Hodgkin-Lymphoms (URL-1).	6
Abbildung 3: pcDNA TM 6.2-GW/EmGFP-miR (URL-15).	16
Abbildung 4: PCR mit HERV-H Primern.	28
Abbildung 5: PCR mit ERVL, HERVK14I, HERV15I, HERV17 und HARLEQUIN.	29
Abbildung 6: PCRs mit Gen-assoziierten endogenen Retroviren.	30
Abbildung 7: RT-PCR des CYP4Z1-assoziierten endogenen Retrovirus (Region 1).	31
Abbildung 8: RT-PCR des CYP4Z1-assoziierten endogenen Retrovirus (Region 2).	32
Abbildung 9: RT-PCR des FANCD2-assoziierten endogenen Retrovirus.	32
Abbildung 10: RT-PCR des BLM-assoziierten endogenen Retrovirus.	33
Abbildung 11: RT-PCR des DKC1-assoziierten endogenen Retrovirus.	33
Abbildung 12: RT-PCR des TRIM24-assoziierten endogenen Retrovirus.	34
Abbildung 13: PCR mit den Primern für HERV CYP4Z1(2).	35
Abbildung 14: HERV Expression in L-428 ohne und mit Östrogen.	36
Abbildung 15: HERV Expression in L-1236 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	36
Abbildung 16: HERV Expression in L-540 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	37
Abbildung 17: HERV Expression in KM-H2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	37
Abbildung 18: HERV Expression in HDLM-2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	38
Abbildung 19: HERV Expression in EREB2-5 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	39
Abbildung 20: HERV Expression in A2+2310 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	39
Abbildung 21: PCRs mit den Gen-Primern für DKC1, BLM TRIM24, FANCD2 und c-myc.	40
Abbildung 22: Gen-Expression in L-428 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	41
Abbildung 23: Gen-Expression in L-1236 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	42
Abbildung 24: Gen-Expression in L-540 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	42

Abbildung 25: Gen-Expression in KM-H2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	43
Abbildung 26: Gen-Expression in HDLM-2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	43
Abbildung 27: Gen-Expression in EREB2-5 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	44
Abbildung 28: Gen-Expression in A2+2310 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe).	45
Abbildung 29: Primerbindestellen und miR-Bindesequenzen des Gens CYP4Z1.	46
Abbildung 30: SMART-PCR mit CYP4Z1 zur Bestimmung des Transkriptionsstartes.	48
Abbildung 31: PCR mit CYP4Z1.	49
Abbildung 32: PCR mit vorwärts Primer für HERV CYP4Z1(2) und rückwärts Primer für CYP4Z1.	50
Abbildung 33: PCR mit CYP4Z2P.	50
Abbildung 34: Real-Time PCR mit Primern für CYP4Z2P.	51
Abbildung 35: Vergleich aller Sequenzen von CYP4Z1.	55
Abbildung 36: Gen-Transkripte von CYP4Z1.	56
Abbildung 37: Restriktionsverdau Vektor miR 1.	57
Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopie an Tag 2 nach Transfektion.	58
Abbildung 39: Ergebnis der FACS-Analysen der Transfektionen 1 und 2.	59
Abbildung 40: Real-Time PCR mit Primern für das Gen CYP4Z1 der L-428 Zellen nach Transfektion mit Vektor miR 1.	60
Abbildung 41: Real-Time PCR mit Primern für HERV CYP4Z1(1) der L-428 Zellen nach Transfektion mit Vektor miR 2.	60
Abbildung 42: Real-Time PCR mit Primern für HERV CYP4Z1(2) der L-428 Zellen nach Transfektion mit dem miR Leervektor.	61
Abbildung 43: 3D-Proteinstruktur.	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete CEL-Files	9
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Primer- und miR-RNAi Sequenzen.	14
Tabelle 3: RNA-Konzentration der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Präparationen.	19
Tabelle 4: Pipettierschema der Ansätze der Reversen Transkription.	20
Tabelle 5: Pipettierschema der RT-PCR Ansätze.	20
Tabelle 6: Pipettierschema der Standard PCR Ansätze.	21
Tabelle 7: Sequenzier-PCR-Ansatz.	21
Tabelle 8: Pipettierschema der Erststrangsynthese.	22
Tabelle 9: PCR mit Ampli Taq Gold.	23
Tabelle 10: PCR mit GoTaq.	23
Tabelle 11: Ansatz zur Hybridisierung der siRNAs.	25
Tabelle 12: Ligationsansätze.	25
Tabelle 13: Gen-assoziierte HERV-Regionen auf der genomischen DNA.	30
Tabelle 14: Probe Set Expression des Gens CYP4Z1.	47
Tabelle 15: Zur Expression von CYP4Z1 korrelierende Gene.	57

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired Immune Deficiency Syndrome
ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
bp	Basenpaare
CD58	CD58 molecule
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
c-fgr	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
CYP46A1	cytochrome P450, family 46, subfamily A, polypeptide 1
CYP4Z1	cytochrome P450, subfamily Z, polypeptide 1
CYP19A1	cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKC1	dyskeratosis congenita 1, dyskerin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP	Epstein-Barr-Virus (Human herpesvirus 4) nuclear antigen 1, 2, 3A, 3B, 3C, LP
EBV	Epstein-Barr-Virus
E2F	E2F transcription factor
EPAG	early lymphoid activation protein
ETF2	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
ETNK1	ethanolamine kinase 1
FA/BRCA	Fanconi anemia/Breast cancer Pathway
FACS	fluorescence activated cell scanning
FANCA, -C, -D2, -E, -F, -G	Fanconi anemia, complementation group A, D2, E, F, G
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEO-DataSet	Gene Expression Omnibus-DataSet
HERVs	humane endogene Retroviren
HIV	human immunodeficiency virus
HTLV1	human T-cell leukemia virus 1

IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1
IKB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
IKBKAP	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein
IRAK1BP1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1
Kb	Kilobasenpaare
LCL	lymphoblastoid cell lines
LMP1, 2A, 2B	Latentes Membranprotein 1, 2A, 2B (EBV)
LTR	long terminal repeat
LZG	Landeszentrum für Zell- und Gentherapie des Universitätsklinikums in Halle (Saale)
MCM10	minichromosome maintenance complex component 10
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFKB	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells
ORF	open reading frame
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
RBP-Jk	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
REL, -A, -B	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, B (avian)
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Real-Time-PCR
SAMSN1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1
SMART-PCR	switching mechanism at 5' end of RNA transcript polymerase chain reaction
TAE	Tris-acetate-ethylene-diamine-tetraacetic-acid
TRIM24	TRIMpartite Motif 24
SH2D1B	SH2 domain containing 1B

SMART-RACE	switching mechanism at 5' end of RNA transcript/ rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction
------------	--

1 Einleitung

Das Hodgkin-Lymphom (Morbus Hodgkin) ist eine maligne Erkrankung monoklonaler B-Zellen, welche aus den B-Zellen der Keimzentren in Lymphknoten hervorgehen. Histologisch sind große blastische Zellen (Hodgkin-Zellen) und Sternberg-Reed-Zellen auffällig, welche sich in einem Infiltrat aus kleinen Monozyten, Fibroblasten und Lymphozyten befinden. Dieses Infiltrat ist entzündlich und sehr reaktiv. Unterschieden wird zwischen dem klassischen Hodgkin-Lymphom (95% aller Erkrankungen) und dem nodulären lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphom (5% aller Erkrankungen) (Krams et al, 2010). In Europa und den USA werden auf 100.000 Einwohner zwei bis drei Erkrankte vermerkt. Ein Großteil der Erkrankungen erfolgt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, wobei Männer geringfügig häufiger betroffen sind als Frauen. Die Ursachen sind bis heute nicht genau geklärt. Allerdings sind das Epstein-Barr-Virus und Mutationen des Tumorsuppressorgens *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells α* (IKB α) vermutlich beteiligt an der Tumorentstehung, da diese zu einer unkontrollierten Aktivität des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor of Kappa Light Chain Gene Enhancer in B-Cells* (NFKB) führen (Schmoll et al, 2006). NFKB konnte in vielen Zelltypen detektiert werden, die Chemokine, Cytokine, Zell-Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren exprimieren. Weiterhin konnte dieser Transkriptionsfaktor in Verbindung mit diversen Krankheitsstadien gebracht werden. NFKB wird beispielsweise durch Cytokine, freie Radikale, Strahlung oder durch Bakterien beziehungsweise Virenpartikel aktiviert. Eine ungünstige Aktivierung führt im Organismus zu entzündlichen Prozessen in Kombination mit septischem Schock, Asthma, *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) oder anderen Erkrankungen sowie Überexpression von Genen. Im Gegensatz dazu bewirkt die Inhibierung von NFKB verzögertes Zellwachstum, fehlerhafte Entwicklung von Zellen des Immunsystems bis hin zum Zelltod. Mit den Onkogenen *v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, B (avian)* (REL, RELA und RELB) bildet NFKB einen Komplex, welcher durch Proteine der IKB-Familie inhibiert werden kann. In Arbeiten von Yamamoto et al. (2001), Park et al. (2007) oder auch Pikarsky et al. (2004) konnte NFKB in Verbindung mit Tumorerkrankungen gebracht werden (URL-4). Hier wurde gezeigt, dass NFKB entzündliche Prozesse in Verbindung mit der Tumorphagenese begünstigt (Pikarsky et al, 2004). Als weitere Ursache für die Pathogenese des Morbus Hodgkin könnten humane endogene Retroviren (HERVs) in Betracht gezogen werden. Das menschliche Genom besteht zu etwa 8% aus Elementen endogener Retroviren, welche in 31 Familien eingeteilt werden können (Doerr et al, 2002). Diese sind sich in ihrer Genomorganisation, speziell im Vorkommen von Long Terminal Repeat-Sequenzen (LTRs), sehr ähnlich. Solche Sequenzen können beispielsweise alternative Promotoren

darstellen. Retrovirale Sequenzen konnten bereits in unterschiedlichen Tumorgeweben nachgewiesen werden. Ein eindeutiger Beweis für einen Zusammenhang zwischen HERVs und der Tumorphagenese wurde bisher allerdings noch nicht erbracht (Ruprecht et al, 2008).

1.1 Humane endogene Retroviren (HERVs)

1.1.1 HERVs allgemein

Die humanen endogenen Retroviren (kurz HERVs) wurden im Laufe der Evolution in das Genom des Wirts integriert und weitergegeben. Die Infektion erfolgt dabei über die Keimbahnzellen. Im Gegensatz zu exogenen Retroviren, wie dem *human immunodeficiency virus* (HIV) oder dem *human T-cell leukemia virus* (HTLV), sind HERVs in allen Wirtszellen vertreten. Endogene Retroviren werden auch als Proviren bezeichnet und wurden im Laufe der Evolution durch Deletionen, Mutationen oder Rekombinationen inaktiviert oder es kommt durch starke Methylierung nicht zur Expression dieser Viren (Doerr et al, 2002).

1.1.2 Funktionen von HERVs im Organismus

Die meisten HERVs wurden im Laufe der Evolution durch unterschiedliche Faktoren inaktiviert, allerdings besitzen einige noch *open reading frames* (ORFs), was auf eine (patho)physiologische Aufgabe hindeutet. In Keimzelltumoren konnten weiterhin nicht-infektiöse Viruspartikel nachgewiesen werden. Durch intrazelluläre Restriktionsfaktoren wie beispielsweise Mitglieder der TRIM (*TRIPartite Motif*) Familie können Neuinfektionen und die Expression von endogenen Retroviren verhindert beziehungsweise gehemmt werden. Allerdings konnte in der Plazenta eine verstärkte HERV-Expression nachgewiesen werden. Beispielsweise tragen sie zum Schutz des Embryos vor Abstoßungsreaktionen oder zum Plazentaufbau im Zusammenspiel mit anderen Genen bei. *Long terminal repeat* (LTR)-Sequenzen endogener Retroviren können weiterhin Regulatoren darstellen, wodurch die Expression der umliegenden Gene beeinflusst werden kann (Doerr et al, 2002).

1.1.3 Einfluss endogener Retroviren auf die Tumorphagenese

Die Rolle endogener Retroviren im menschlichen Genom ist bislang, im Gegensatz zu exogenen Retroviren, unklar. Letztere können an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein, beispielsweise HTLV-1 bei Leukämien. Grund hierfür sind Insertionsmutagenesen ausgelöst durch Integration des Provirus in der Nähe von Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen (Doerr et al, 2002). Zahlreiche endogene Retroviren sind sich in ihrer Genomorganisation und dem Vorkommen von LTR-Sequenzen sehr ähnlich. Daher stehen sie im Verdacht an der Entstehung von Krankheiten des Menschen, wie beispielsweise auch Krebs, beteiligt zu sein. Eindeutige Beweise hierfür existieren bislang jedoch nur für sehr wenige HERVs und dies auch nur für Tiermodelle. *Ribonucleic acid* (RNA)-Transkripte humaner endogener Retroviren konnten bereits in Zelllinien und Proben unterschiedlicher Krebsarten nachgewiesen werden. Allerdings steht nicht fest ob es sich um einen Zufall handelt oder ob wirklich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von HERVs und der Tumorphagenese besteht (Ruprecht et al, 2008).

1.2 Aufbau und Funktion des Gens CYP4Z1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde *cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1 [Homo sapiens]*, kurz CYP4Z1, als ein Gen identifiziert, welches in Hodgkin-Lymphomzellen teilweise hoch exprimiert wird und welches zu HERVs assoziiert ist. CYP4Z1 gehört zur Cytochrom P450 Enzym-Superfamilie. Diese Proteine gehören zu den Monooxygenasen und katalysieren metabolische Entgiftungsprozesse sowie die Synthese von Lipiden, Cholesterin oder Steroiden. Das Gen CYP4Z1 besitzt im menschlichen Organismus den Genlokus 1p33. Die mRNA hat eine Sequenzlänge von 1907 bp. Dies entspricht den 12 Exons dieses Gens (URL-6). Das Protein, welches 505 bp umfasst, weist nur drei konservierte Reste auf, allerdings ist die generelle Struktur und Faltung hoch konserviert. Die meisten dieser Proteine sind wasserlöslich (URL-7).

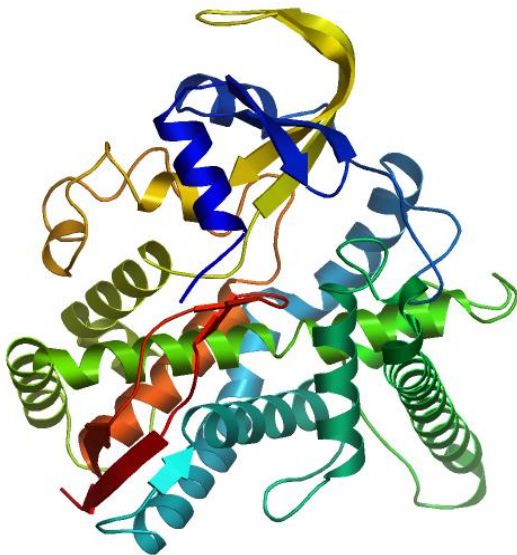


Abbildung 1: Struktur des Cytochrom P450, Subfamilie Z, Polypeptid 1 (SWISS-Model). Mit Hilfe des Tools *SWISS Model* wurde anhand der mRNA Sequenz aus der Gene-Datenbank des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) die 3D-Struktur dieses Proteins vorhergesagt.

In erster Linie dienen Enzyme der Cytochrom P450 Familie der Entgiftung des Organismus. Hierzu zählen unter anderem die Verstoffwechselung von Schmerzmitteln, Chemikalien, giftigen Pflanzenbestandteilen, karzinogenen Substanzen oder auch Umweltgiften. Zunächst wird ein Sauerstoffatom an die zu eliminierende Substanz gebunden. Dies dient der Erhöhung der Wasserlöslichkeit. Gleichzeitig stellt dies eine Bindungsstelle für andere Enzyme dar, welche ebenfalls der Entgiftung dienen. Die Addition des Sauerstoffs sowie der eigentliche Prozess der Entgiftung stellen einen hoch komplexen Prozess dar, in welchen unter anderem ein Eisenatom der Hämgruppe des Cytochroms involviert ist. Cytochrom P450 Enzyme sind in allen Organismen zu finden. Im menschlichen Organismus existieren etwa 60 unterschiedliche Formen dieser Proteine (URL-8).

1.3 Chromosomeninstabilitätssyndrome

In vorangegangenen Untersuchungen wurden Expressionsstudien an Chromosomeninstabilitätssyndrom-Genen durchgeführt, welche mit HERVs assoziiert sind. Bei einem Chromosomeninstabilitätssyndrom (Chromosomenbruchsyndrom oder

auch Mutagen-Hypersensitivitäts Syndrom) handelt es sich um eine Erkrankung, welche auf einem fehlerhaften DNA-Reparatur-Mechanismus beruht. Zu diesen Syndromen zählen neben der Fanconi-Anämie und dem Bloom-Syndrom auch Ataxia-Telangiektasie oder das Nijmegen Breakage-Syndrom. Diese Erkrankungen werden autosomal-rezessiv vererbt (Buselmaier et al, 2007). Ein Zusammenhang mit der Pathogenese maligner Tumore konnte 1960 bewiesen werden. Solche Anomalien zeigen sich bevorzugt bei Leukämien und Lymphomen. Zuordnungen zu spezifischen Subtypen der Chromosomeninstabilitätssyndrome haben Einfluss auf Prognose und Therapie beim Auftreten einer malignen Erkrankung (URL-2).

1.3.1 Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie ist eine genetische Funktionsstörung, welche zu Instabilitäten im Genom führt. Daraus resultieren Abnormalitäten im Knochenmark und Organsystem. Weiterhin besteht ein erhöhtes Krebsrisiko. Die Fanconi-Anämie ist gekennzeichnet durch eine Überempfindlichkeit gegenüber *DNA-Crosslinking-Agents* und zeichnet sich durch eine hohe Dichte an Chromosomenanomalien aus, welche auf Defekten bei der DNA-Reparatur beruhen. Die Proteine FANCA, -C, -E, -F und -G sind Bestandteile eines Proteinkomplexes, welcher die Monoubiquitinierung des FANCD2 Proteins aktiviert. Die Wirkung von FA/BRCA ist mit verantwortlich für die Reparatur von DNA-Schäden. Zu den Symptomen der Fanconi Anämie zählen unter anderem prä- und postnatale Wachstumshemmung, Organfehlbildungen, Hörschäden, verminderte Fruchtbarkeit, Abnormalitäten der Haut und eine verminderte Lebenserwartung von 20 Jahren (URL-3).

1.3.2 Bloom-Syndrom

Das Bloom-Syndrom ist eine autosomal rezessive Funktionsstörung. Charakteristisch sind proportionale prä- und postnatale Wachstumsstörungen, Empfindlichkeit gegenüber ultravioletter Strahlung, Teleangiektasie, hypo- und hyperpigmentierte Haut und Chromosomeninstabilitäten. Das Risiko einer Tumorerkrankung ist stark erhöht (URL-4). Weiterhin zeigt sich eine verlangsamte DNA-Replikation und zahlreiche Schwesterchromatid-Austausche, hervorgerufen durch Mutationen im Bloom-Gen (BLM). Das BLM-Protein ist eine Helicase und verantwortlich für die Genomstabilität (Hirsch-Kauffmann et al, 2009).

1.4 Zelltypen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit unterschiedlichen Zelllinien gearbeitet, welche im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.4.1 Zellen des Hodgkin-Lymphoms

Histologisch sind beim Hodgkin-Lymphom die gleichnamigen Hodgkin-Zellen und Sternberg-Reed-Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 2). Diese entwickeln sich meist aus B-Zellen der Keimzentren von Lymphknoten.

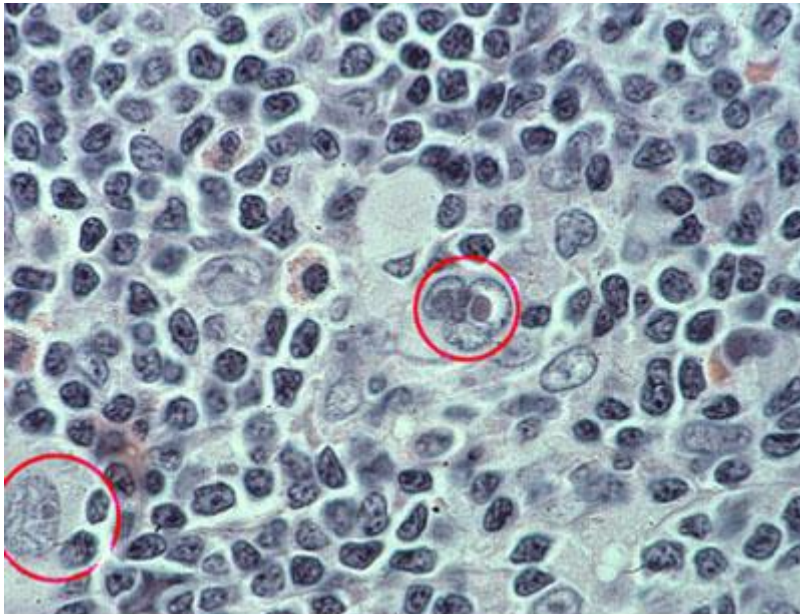


Abbildung 2: Sternberg-Reed-Zellen des Hodgkin-Lymphoms (URL-1). Rot markiert sind Sternberg-Reed-Zellen. Bei allen anderen Zellen handelt es sich um normale Lymphozyten.

Hodgkin-Zellen sind blastisch, mononuklear und besitzen einen prominenten Nukleolus sowie einen extrinsischen Kern (Berger et al, 2010).

Mehrere Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms konnten bislang etabliert werden. Die Zelllinie L-428 wurde 1978 aus dem Pleuraerguss einer 37-jährigen Frau gewonnen. Aus dem peripheren Blut eines 34-jährigen Mannes wurde 1994 die Zelllinie L-1236 etabliert. L-540, eine weitere Zelllinie des Hodgkin-Lymphoms wurde aus dem Knochenmark einer 20 Jahre alten Frau gewonnen. Aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes ging 1974 die Hodgkin-Zelllinie KM-H2 hervor. Ebenfalls aus einem Pleuraerguss wurde 1982 HDLM-2 etabliert. Der Spender war ein 74 Jahre alter Mann. Die Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen (URL-5).

1.4.2 Peripheres Blut (PBMCs)

Zu den Zellen des peripheren Blutes gehören Bluteiweißstoffe und Blutzellen, das heißt Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. PBMCs werden aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark gebildet. Hierfür werden Botenstoffe, wie hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Cytokine, benötigt (Wagner et al, 2011).

1.4.3 Lymphoblastoide Zellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um Epstein-Barr-Virus (EBV) aktivierte B-Zellen, welche dadurch in ihrer Zellmorphologie verändert wurden. Eine Immortalisierung erfolgt nach einer Wachstumskrise, welche die Telomeraseaktivität reaktiviert. Diese Zelllinien sind somit wichtiger Bestandteil der Tumorforschung (Siemer, 2008). Zu diesen Zellen gehören die Zelllinien A2+2310 sowie EREB2-5. An dieser Stelle soll zunächst auf die Entstehung der zuletzt genannten Zelllinie eingegangen werden.

EBV ist ein ubiquitär vorhandenes menschliches Herpes-Virus mit einem linearen Genom von etwa 175 kb. Das Virus hat die Fähigkeit zur Infektion von B-Lymphozyten und Epithelzellen. Eine Infektion von B-Lymphozyten ist meist nicht produktiv. Findet diese jedoch in den Epithelzellen des Rachenraums statt, kommt es zur Virusreplikation und somit zur Abgabe von Viren in den Speichel. Eine Primärinfektion verläuft meist unbemerkt. Allerdings kann es zu einem Auftreten von Pfeifferschem Drüsenfieber kommen. Das Virus verbleibt nach Primärinfektion ein Leben lang im Organismus. Eine EBV Infektion führt *in vitro* zu einer unbegrenzten Proliferation der infizierten Zellen. Hierbei kommt es zur Expression von viralen Genen. Dazu gehören sechs nukleare Antigene des Epstein-Barr-Virus (EBNA1, 2, 3A, 3B und 3C sowie EBNA-LP) und drei Membran-Antigene (LMP1, LMP2A und LMP2B) des sowie zwei RNA Polymerase II Transkripte. Solche Zellen werden lymphoblastoide Zellen (LCL) genannt. Durch EBNA1, 2, 3A, 3C und LMP1 kommt es zur Transformation. EBNA2 ist eines der ersten Gene, welche nach EBV Infektion exprimiert wird. Hierbei handelt es sich um einen transkriptionalen Aktivator viraler und zellulärer Gene, welcher essentiell für das Transformationspotential des Virus ist. EBNA2 passt die Expression der Wirtsgene durch die Induktion der Antigene CD21 und CD23 und dem Protoonkogen c-fgr an. Außerdem aktiviert es die Transkription von drei viralen Membran-Antigenen. EBNA2 bindet nicht direkt an die DNA. Es transaktiviert die LMP2A und LMP2C Promotoren durch Bindung an ein zelluläres Protein, welches an spezifische Sequenzmotive bindet und zu einer EBNA2 Antwort führt. Dieses zelluläre Protein wurde als RBP-Jk identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein ubiquitär exprimiertes und hoch konserviertes Protein. Die

Transformation einer B-Zelle zu einer lymphoblastoiden Zelle ist ein nicht synchron verlaufender und komplexer Prozess. Dies umfasst nicht nur eine Interaktion fünf viraler Gene (EBNA1, 2, 3A, 3C und LMP1) sondern auch die Stimulation der Wirtszelle durch den Virusrezeptor. In der Arbeit von Kempkes et al. konnte gezeigt werden, dass menschliche B-Zellen in Anwesenheit von EBNA2 durch EBV transformiert werden. Diese Zellen verharren in der G1 und G2 Phase des Zellzyklus wenn EBNA2 entzogen wird. Zellen, welche sich in der G1 Phase befinden, sind in der Lage in den Zellzyklus nach Reaktivierung von EBNA2 einzutreten. Viren, welche Mutationen in EBNA2 aufweisen, sind nicht mehr in der Lage, B-Zellen zu immortalisieren. Durch Koinfektion von Nabelschnurzellen mit einem solchen immortalisierungsdefizienten Virusstamm und einem „Mini-EBV“, welches die EBNA2-Funktion in Form eines Fusionsproteins aus EBNA2 und dem Östrogenrezeptor bereitstellt, konnte eine konditional immortalisierte LCL gewonnen werden. Diese Zelllinie, EREB2-5, wächst nur in Anwesenheit von Östrogen im Kulturmedium. Nach Östrogenentzug arretieren die Zellen im Zellzyklus und beginnen nach einigen Tagen zu sterben (Kempkes et al, 1995). Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der Linie A2+2310 um eine LCL, welche mit einem immortalisierungskompetenten EBV-Stamm (B95.8) infiziert wurde und daher ohne weitere Zellkulturzusätze proliferiert.

1.5 Erkenntnisse vorangegangener Arbeiten

In vorangegangenen Untersuchungen wurden Genexpressionsprofile, welche durch Filterung vorhandener Microarray-Daten gewonnen wurden, auf differentielle Expression in Zellen des Hodgkin-Lymphoms untersucht. Als Vergleichsbasis dienten hierfür insbesondere Zellen des peripheren Blutes. Als Quelle hierfür diente dabei die GEO (*Gene Expression Omnibus*)- Datenbank des NCBI (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete CEL-Files

<i>Morbus Hodgkin Zelllinie</i>	<i>Zellen des menschlichen peripheren Blutes</i>
Staage1_(HuEx-1_0-st-v2).CEL (Müller, 2011)	GSM466899.CEL
	GSM466900.CEL
	GSM466901.CEL
	GSM466902.CEL
	GSM466903.CEL
	GSM466904.CEL
	GSM466905.CEL
	GSM466906.CEL
	GSM466907.CEL
	(Shehadeh et al, 2010)

Mit diesen Daten wurde eine Exon Level Analyse mit der *Expression Console* von Affymetrix durchgeführt und die Daten mit den Programmen *MAFilter* (Winkler et al, 2012) und *HERV Test* (Kruse, 2011) analysiert. Es wurde speziell auf die Gene BLM, FANCD2, DKC1, TRIM24 und CYP4Z1 eingegangen, da diese neben einer Hochregulation in Hodgkin-Zellen eine Assoziation zu HERVs zeigten. Die Daten wurden mittels PCR Methoden validiert und bestätigt. Weiterhin konnten Spleißvarianten identifiziert werden, welche ebenfalls Assoziationen zu humanen endogenen Retroviren zeigten. Die Untersuchungsergebnisse für Transkripte des Gens CYP4Z1 waren dabei am interessantesten, da diese ausschließlich in Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms nachgewiesen werden konnten.

In dieser Arbeit soll daher, aufbauend auf den bereits vorliegenden Ergebnissen, ein Einfluss veränderter, HERV-assoziiierter Gen-Transkripte auf die Hodgkin-Lymphom-Pathogenese tiefgreifender betrachtet werden.

2 Zielstellung

Das Hodgkin Lymphom ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems, welche bei Kindern und Jugendlichen etwa 5% aller bösartigen Erkrankungen im Kindesalter ausmacht. Erwachsene sind zehnmal häufiger betroffen. Die Ätiologie ist bislang nicht endgültig geklärt, allerdings scheinen Immundefektsyndrome als auch genetische Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen (Gutjahr, 2004). Vermutlich zählen hierzu auch eine Begünstigung der Pathogenese durch veränderte Genexpression sowie das Auftreten von humanen endogenen Retroviren. Aufbauend auf vorangegangenen Untersuchungen (siehe Kapitel 1.5) soll zunächst überprüft werden, ob zu den Genen BLM, DKC1, CYP4Z1, FANCD2 und TRIM24 assoziierte HERVs exprimiert werden und ob es auch hier zu einer Hochregulation dieser Transkripte kommt. Mittels Sequenzierung sollte überprüft werden, ob Mutationen innerhalb der HERV-Transkripte nachweisbar sind. Genauere Untersuchungen könnten dabei für das Gen CYP4Z1 durchgeführt werden, da die Expression dieses Gens (beruhend auf vorangegangenen Analysen) vermutlich im Zusammenhang mit der Pathogenese oder der Proliferation von Hodgkin-Zellen stehen könnte.

3 Material

3.1 Chemikalien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Chemikalien verwendet:

Agar Agar, Serva (Heidelberg)

Agarose, PEQ Lab (Erlangen)

Aqua B. Braun, B. Braun AG (Melsungen)

Chloroform, Sigma-Aldrich (Steinheim)

DEPC-H₂O, Ambion (Austin, USA)

DNase/RNase free water, Invitrogen (Karlsruhe)

Ethanol 96% reinst, Sigma-Aldrich (Heidelberg)

Ethanol 70% und 80%, Sigma-Aldrich (Heidelberg)

Ethidiumbromid-Lösung, Sigma-Aldrich (Heidelberg)

Isopropanol, Sigma-Aldrich (Heidelberg)

β-Estradiol, Sigma-Aldrich (Heidelberg)

Propidiumiodid, Sigma-Aldrich (Heidelberg)

Spectinomycin, Sigma-Aldrich (USA)

3 M Natriumacetat, Merck (Darmstadt)

3.2 Medien und Puffer

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Medien und Puffer eingesetzt:

LB-Flüssigmedium

25 g LB-Medium Pulver (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl)

1000 ml Wasser

pH = 7

Agar-Platten

25 g LB-Medium Pulver

15 g Agar Agar

1l Wasser

50 µg/ml Spectinomycin

RPMI 1640 - Kulturmedium

RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin

TAE Puffer (50x)

2M Tris-HCl pH 8,0

5,75 % (v/v) Essigsäure

50mM EDTA

S.O.C. Medium Sigma-Aldrich (Heidelberg)

3.3 Zelllinien und Bakterienstämme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien und Bakterienstämme verwendet:

Hodgkin-Lymphomzellen

In dieser Arbeit wurden Hodgkin-Lymphomzellen verwendet, welche sich als etablierte Linien in Kultur befanden. Dazu zählen die Linien L-428, L-1236, L-540, KM-H2 und HDLM-2. Diese wurden von der DSMZ bezogen. Aus diesen Zellen wurde RNA extrahiert. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium.

Zellen des peripheren Blutes

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) dienten als Vergleichsbasis zur Genexpression in Hodgkin-Lymphomzellen. Die verwendeten Zellen werden als BC330 und BC332 (interne Bezeichnung der Arbeitsgruppe) bezeichnet. Hierfür wurde RNA dankenswerterweise von Frau I. Volkmer zur Verfügung gestellt.

Lymphoblastoide Zelllinien

Basierend auf der Vermutung, dass Zellen des Hodgkin-Lymphoms aus lymphoblastoiden Zellen hervorgehen könnten, wurden die lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) EREB2-5 (dankenswerterweise von Georg W. Bornkamm zur Verfügung gestellt), A2+2310 und

NMIIb in die Untersuchungen einbezogen. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium. Für EREB2-5-Zellen wurde das Medium mit 1 μ M Östrogen supplementiert.

Bakterienstämme

Für die Transformation von Vektoren wurden One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.coli* von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

3.4 Enzyme, Fertige Lösungen und Reaktionskits

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Enzyme, Fertige Lösungen und Reaktionskits eingesetzt:

Ampli Taq Gold™, Roche (Mannheim)

BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems (Weiterstadt)

Block-iT Pol II miR RNAi, Invitrogen (Karlsruhe)

CLB Transfection™ Buffer, Lonza (Schweiz)

dNTP-Mix (10mM), Fermentas (St. Leon Roth)

DTT, BD (Heidelberg)

Dulbecco´s PBS (1x), PAA Laboratories GmbH (Pasching)

Elution Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5), Fermentas (St. Leon Roth)

5X First Strand Buffer, BD (Heidelberg)

GeneJet™ Gel Extraction Kit, Fermentas (St. Leon Roth)

Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas (St. Leon Roth)

GeneRuler™ 100bp Plus DNA Leiter, Fermentas (St. Leon Roth)

GoTaq DNA Polymerase, Promega (Mannheim)

GoTaq^R qPCR Master Mix 2X, Promega (Mannheim)

5X Green GoTaq Reaction Buffer, Promega (Mannheim)

Ladepuffer für Agarosegele (6x), Fermentas (St. Leon Roth)

LB-Medium Pulver, Roth (Karlsruhe)

5X Ligation Buffer, Invitrogen (Karlsruhe)

Lysis Solution, Fermentas (St. Leon Roth)
 MgCl₂ Solution, (Roche (Mannheim))
 Neutralization Solution, Fermentas (St. Leon Roth)
 10X Oligo Annealing Buffer, Invitrogen (Karlsruhe)
 Oligo d(T) 12-18 (0,5µg/µl) Primer, Invitrogen (Karlsruhe)
 10X PCR Gold Buffer, Roche (Mannheim)
 5x Reaction Buffer for M-MuLV RT, Fermentas (St. Leon Roth)
 Resuspension Solution, Fermentas (St. Leon Roth)
 Reverse Transkriptase H minus, Fermentas (St. Leon Roth)
 RNaseZap, Ambion (USA)
 Superscript™ II RNase H-Reverse Transcriptase (10 U/µl), BD (Heidelberg)
 T4 DNA Ligase, Invitrogen (Karlsruhe)
 TriFAST™, peqlab (Erlangen)
 Trypanblau, Invitrogen (Karlsruhe)
 Wash Solution, Fermentas (St. Leon Roth)

3.5 Primer und miR RNAi

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 2 zusammengefassten Oligonukleotide verwendet:

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Primer- und miR-RNAi Sequenzen.

Zielsequenz	Primer (vorwärts/rückwärts)	Produktgröße
GAPDH	5'- ccatggagaaggctgggg -3' 5'- caaagttgtcatggatgacc -3'	195 bp
FANCD2(1)	5'- tccgacttgacccaaacttc -3' 5'- tgctggcttcattctgtttg -3'	891 bp
FANCD2(2)	5'- agattcgatcaggctgcatt -3' 5'- tgctggcttcattctgtttg -3'	429 bp
CYP4Z1	5'- aggacttgtgaccctggatg -3' 5'- taggggtgtggtgaagagc -3'	879 bp

CYP4Z1 (Exon 1 – Exon 3)	5'- ttcttgctgctgatcctct -3' 5'- cccaggattcaaggatttg -3'	321 bp
CYP4Z2P	5'- aggacttgtagccctggatg -3' 5'- tcctggcgtctttctgagt -3'	480 bp
TRIM24	5'- cccaagttggagtcattcgt -3' 5'- taggcgctcacacttcctt -3'	2273 bp
BLM	5'-gaaagagaaacccaaccttc -3' 5'- tgcacagatctttctggagtg -3'	687 bp
DKC1(1)	5'- gttccctcggctgtggac -3' 5'- accactgtgccctgtcttct -3'	413 bp
DKC1(2)	5'- gaagatgtagccaatttgataagc -3' 5'- accactgtgccctgtcttct -3'	395 bp
c-myc	5'- ctaccctctcaacgacagc -3' 5'- ctctgacctttgccaggag -3'	247 bp
HERVH	5'- tggctcatccaaatcttc -3' 5'- agcgtcagtttcagccact -3'	964 bp
HERVK14I	5'- tggtaaggaacgctagagc -3' 5'- ctttactccccctcttctg -3'	509 bp
HERV17	5'- tggctgtggaaaacaggtt -3' 5'- atcctgtccagcacctgttg -3'	592 bp
ERVL	5'- tcccagtagctgggactac -3' 5'- aatgctgctgtatcggggtc -3'	514 bp
HERV15I	5'- gtgggtagagccttctgtg -3' 5'- gagaacgggccatgatgaca -3'	566 bp
HARLEQUIN	5'- cgcctgtaatcccagcactt -3' 5'- aaaggcatgccatgggtgat -3'	369 bp
HERV FANCD2	5'- tgagacagtcttgctgtcg -3' 5'- ggtggctcatgcctgtaatc -3'	272 bp
HERV DKC1	5'- ccttccgcagtgtctgtg -3' 5'- ccgtgtctgtgtggagagaa -3'	270 bp
HERV BLM	5'- acggagtctcgtctgtcg -3' 5'- catgcatgtaatcccagcac -3'	260 bp
HERV CYP4Z1(1)	5'- aacaaagctggaggcatcat -3' 5'- gccattgcttttggtgttt -3'	405 bp
HERV CYP4Z1(2)	5'- tcagcaaactatcgcaagga -3' 5'- gggtagatatgcacaacatgaa -3'	252 bp
HERV TRIM24	5'- ggatcacgaggtcaggagat -3' 5'- acggagtcttgctctttgc -3'	221 bp
BD SMART™ T7 Oligonucleotide	5'- actctaatacgactcactataggagagggcggg -3'	-
cDNA Synthesis (CDS) Primer II A	5'- aagcagtggatatcaacgcagagtact -3'	-
T7 Extension Primer	5'- gctctaatacgactcactatagg -3'	-

miR 1 (CYP4Z1)	5'-tgctgaacactctcagacatcatgggtgtttggcc actgactgacacccatgatctgagagtgtt -3' 5'- cctgaacactctcagatcatgggtgtcagtcagt gccaaaacacccatgatgtctgagagtgttc -3'	64 bp
miR 2 (CYP4Z1)	5'- tgctgtaaggcatctggtcaggtgtgtttggccactg actgacacacctgacagatgcctta -3' 5'- cctgtaaggcatctgtcaggtgtgtcagtcagtgcca aaacacacctgagccagatgccttac -3'	64 bp

3.6 Vektoren

miR-Vektor

Der Vektor pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR (siehe Abbildung 3) lag linearisiert im Block-iT Pol II miR RNAi Expression Vectors Kit von Invitrogen vor.

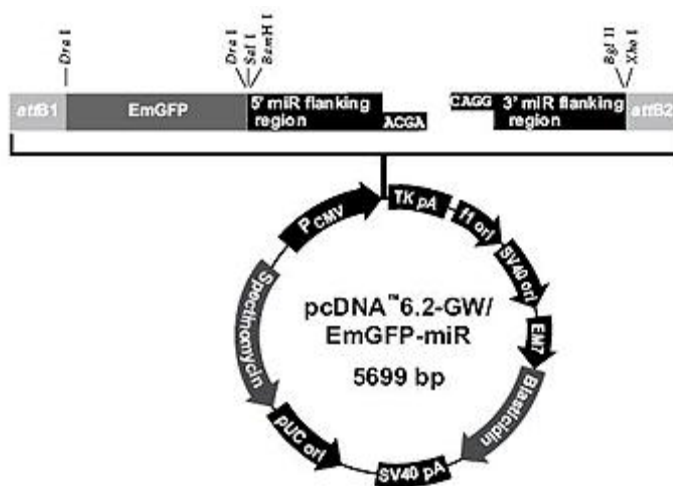


Abbildung 3: pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR (URL-15).
 Nach Transformation einer miR-RNAi wurde das gezeigte Plasmid zur Transfektion der Zelllinie L-428 verwendet. Resistenzen sind gegen Spectinomycin und Blastidicin vorhanden.

Der Vektor pcDNATM 6.2-GW/miR-neg control wurde als Leervektorkontrolle verwendet.

pMaxGFPTM

Der Vektor pMaxGFPTM wurde von Lonza bezogen und als Kontrolle beim Restriktionsverdau mitgeführt.

3.7 Geräte

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte und verwendet:

Brutschrank, Heraeus (Hanau)

Durchflusscytometer (FACScan), Becton Dickinson (Heidelberg)

Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss (Jena)

Gelelektrophoresekammern, Bio-Rad Laboratories (München)

Gene Genius Bio Imaging System (UV-Transilluminator), Syngene (Frederick, USA)

Lichtmikroskop (invers), Axiovert 25 Carl Zeiss (Jena)

Mastercycler personal und ~ gradient, Eppendorf (Hamburg)

Megafuge 1.0, Heraeus (Hanau)

Mikrowelle, Bosch (Stuttgart)

Neubaur Zählkammer, LO Laboroptik (Friedrichsdorf)

Nucleofactor ITM, Lonza (Schweiz)

Rotor Gene RG-3000, Corbett Research (Sydney, Australien)

Schüttler mit Inkubationshaube, Edmund Bühler (Tübingen)

Speed-Vac, Eppendorf (Hamburg)

Spektrophotometer (UV/VIS) DU 800, Beckman Instruments (Brea, USA)

Sterilwerkbank Hera Safe, Heraeus (Hanau)

Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)

Tischzentrifuge Biofuge fresco und ~pico, Heraeus (Hanau)

UV-Tisch, Biotec-Fischer GmbH (Reiskirchen)

Vortex Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, USA)

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden mit RPMI 1640 Medium kultiviert und 2 mal wöchentlich gesplittet. Dies erfolgte je nach Zellwachstum im Verhältnis 1:2 bis 1:4. Bei Kultivierung mit Östrogen wurden die Zellen an Tag 1 abzentrifugiert, in je 5 ml RPMI Medium resuspendiert und jeweils 5 µl 2mM Östrogen hinzugegeben. Anschließend wurden die Ansätze in eine 6-Well Platte überführt und bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert.

4.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus Zellen des Hodgkin-Lymphoms und lymphoblastoiden Zellen erfolgte mittels TriFast™ (RNA der Zelllinien NMIIb, BC330 und BC332 wurde freundlicherweise von Frau I. Volkmer zur Verfügung gestellt). Nach Desinfektion des Arbeitsplatzes und der zu verwendenden Pipetten mit RNase Zap wurden die genannten Zellen zunächst bei 95 xg für 10 Minuten zentrifugiert und die Pellets mit kaltem TriFast™ homogenisiert. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 16.089 xg und 4°C zentrifugiert. 1000 µl des Überstandes wurden jeweils in ein neues Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kräftigem Schütteln wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wieder für 15 Minuten bei 16.089 xg und 4°C zentrifugiert. Die jeweils klare RNA-Phase (obere Schicht) wurde in ein neues Röhrchen überführt und je 500 µl Isopropanol hinzu pipettiert. Nachdem die Proben gevortext worden waren, wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss für 10 Minuten bei 16.089 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum entstandenen Pellet je 1000 µl kaltes 80%-iges Ethanol hinzupipettiert und bis zum vollständigen Lösen des jeweiligen Pellets gevortext. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 7711 xg und 4°C. Nachdem das entstandene Pellet unter der Sterilbank für etwa zehn Minuten getrocknet worden war, wurde es mit 70µl DEPC Wasser resuspendiert. Im Thermomixer wurden die Proben anschließend für 10 Minuten auf 65°C erhitzt.

Nach einer 1:100 Verdünnung der einzelnen Proben ergab die Messung der RNA-Konzentrationen im DU 800 Spectrophometer folgende Werte (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: RNA-Konzentration der in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Präparationen.

Zelllinie	RNA-Konzentration	Zelllinie + Östrogen	RNA-Konzentration
L-428	3,145 µg/µl	L-428 +E (T2)	1,020 µg/µl
		L-428 +E (T4)	0,893 µg/µl
L-1236	0,935 µg/µl	L-1236 +E (T4)	0,523 µg/µl
L-540	0,856 µg/µl	L-540 +E (T4)	1,226 µg/µl
KM-H2	0,569 µg/µl	KM-H2 +E (T4)	0,332 µg/µl
HDLM-2	0,511 µg/µl	HDLM-2 +E (T4)	0,720 µg/µl
NMIIb	1,044 µg/µl		
A2+2310	0,735 µg/µl	A2+2310 +E (T4)	0,362 µg/µl
EREB2-5	0,308 µg/µl	EREB2-5 +E (T4)	1,376 µg/µl
BC330	1,843 µg/µl		
BC332	0,546 µg/µl		
L-428 miR 1 Transfektion 1	0,287 µg/µl		
L-428 miR 1 Transfektion 2	0,367 µg/µl		
L-428 miR 2 Transfektion 1	0,159 µg/µl		
L-428 miR 2 Transfektion 2	0,569 µg/µl		
L-428 miR Leervektor Transfektion 1	0,212 µg/µl		
L-428 miR Leervektor Transfektion 2	0,266 µg/µl		

Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.3 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Zur Realisierung der geplanten PCR Untersuchungen, musste aus der RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Dafür wurden die aus Tabelle 4 ersichtlichen Ansätze pipettiert.

Tabelle 4: Pipettierschema der Ansätze der Reversen Transkription.

Reagenz	Volumen
5x Reaction Buffer RT	4 µl
Oligo d(T) 12-18 Primer	1 µl
Reverse Transkriptase H minus	1 µl
dNTP-Mix (10mM)	1 µl
RNA (2 µg)	X µl
DEPC Wasser	13-X µl
Gesamt	20 µl

Die jeweiligen Ansätze wurden im Thermocycler bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte ein Inaktivierungsschritt der Reverse Transkriptase für 5 Minuten bei 90°C. Die cDNA wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.4 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

4.4.1 Real-Time PCR

Folgende Ansätze wurden zur Durchführung einer Real-Time PCR pipettiert (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: Pipettierschema der RT-PCR Ansätze.

Reagenz	Volumen
GoTaq [®] qPCR Master Mix	10,00 µl
DEPC Wasser	6,00 µl
vorwärts Primer	1,00 µl
rückwärts Primer	1,00 µl
cDNA	2,00 µl
Gesamt	20,00 µl

Alle durchgeführten RT-PCR Läufe wurden mit folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung für 45 Sekunden bei 95°C, Primerannealing für 45 Sekunden bei 60°C und Elongation für 60 Sekunden bei 72°C

4.4.2 Standard PCR

Für die Standard PCR wurden die aus Tabelle 6 hervorgehenden Ansätze pipettiert.

Tabelle 6: Pipettierschema der Standard PCR Ansätze.

Reagenz	Volumen
5x Green GoTaq Reaction Buffer	5,00 µl
dNTP-Mix (10mM)	0,50 µl
left Primer	0,25 µl
right Primer	0,25 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,20 µl
Braun-Wasser	16,80 µl
cDNA	2,00 µl
Gesamt	25,00 µl

Für Produktgrößen größer als 700 bp wurden die PCR-Bedingungen folgendermaßen gewählt: Denaturierung für 45 Sekunden bei 95°C, Primerannealing für 45 Sekunden bei 60°C und Elongation für 60 Sekunden bei 72°C. Bei kleineren Fragmenten wurden die einzelnen Schritte jeweils um 15 Sekunden verkürzt. In beiden Fällen wurden 35 Zyklen durchgeführt.

Bei der Gradienten-PCR wurde die Annealingtemperatur variiert. Die dabei verwendeten Ansätze wurden identisch pipettiert.

4.4.3 Sequenzier-PCR

Zur Feststellung der genauen Basenfolge der PCR-Produkte wurde teilweise eine Sequenzierung dieser Produkte durchgeführt. Dafür wurden folgende Ansätze pipettiert (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: Sequenzier-PCR-Ansatz.

Reagenz	Volumen
Primer vorwärts oder rückwärts	0,2 µl
HPLC-Wasser	4,5 µl
BigDye-Mix	4,0 µl
DNA aus Gelextraktion	1,0µl
gesamt	9,7 µl

Die jeweiligen Ansätze wurden im Thermocycler inkubiert. Dabei wurden 30 Zyklen durchgeführt wobei jeweils 10 Sekunden bei 96°C und 4 Minuten bei 60°C inkubiert wurde.

4.4.4 SMART-PCR

4.4.4.1 Erststrangsynthese

Für die *switching mechanism at 5' end of RNA transcript*-PCR (SMART-PCR) erfolgte zunächst die Erststrangsynthese. Dazu wurden 2 µg der RNA aus L-428-Zellen (0,636 µg/µl) zusammen mit 9,364 µl DEPC Wasser und 1 µl Oligo (dT) in Ansatz 1 und 1 µl CDSIIA-Primer in Ansatz 2 für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und danach 2 Minuten in Eiswasser abgekühlt. Zu diesen Ansätzen wurden jeweils hinzupipettiert:

Tabelle 8: Pipettierschema der Erststrangsynthese.

Reagenz	Volumen
Superscript TM II RNase H-Reverse Transcriptase (10 U/µl)	1,0 µl
5X First Strand Buffer	4,0 µl
DTT (100 mM)	2,0 µl
dNTP Mix	1,0µl
BD SMART T7 Oligonucleotide (10 µM)	1,0 µl
gesamt	20,0 µl

Die Ansätze wurden im Thermocycler für 90 Minuten bei 42°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung für 10 Minuten bei 68°C.

4.4.4.2 PCR

Zur PCR wurden anschließend die in Tabelle 9 und 10 gezeigten Ansätze pipettiert (insgesamt 4 Ansätze).

Tabelle 9: PCR mit Ampli Taq Gold.

Reagenz	Volumen
Ampli Taq Gold	0,2 µl
Braun-Wasser	17,3 µl
10X PCR Gold Buffer	2,5 µl
T7 Extension Primer	1,0µl
Primer CYP4Z1 rückwärts	0,2 µl
MgCl ₂	1,5 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
cDNA aus Erststrangsynthese 1/2	2,00 µl
gesamt	25,00 µl

Tabelle 10: PCR mit GoTaq.

Reagenz	Volumen
5x Green GoTaq Reaction Buffer	5,00 µl
dNTP-Mix (10mM)	0,50 µl
T7 Extension Primer (10mM)	0,50 µl
Primer CYP4Z1 rückwärts (10mM)	0,20 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,20 µl
Braun-Wasser	16,10 µl
cDNA aus Erststrangsynthese 1/2	2,00 µl
Gesamt	25,00 µl

Die Ansätze wurden im Thermocycler inkubiert. Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt: Denaturierung für 15 Sekunden bei 95°C, Primerannealing für 30 Sekunden bei 65°C und Elongation für 180 Sekunden bei 68°C. Es wurden 24 Zyklen durchgeführt.

4.5 Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der PCR-Ergebnisse wurde jeweils ein 1,5%-iges Agarosegel aus 80ml 1xTAE-Puffer, welchem 1,2 g Agarose und 6 µl Edithiumbromid zugegeben wurde, verwendet.

4.6 Gelextraktion

Die Extraktion von PCR-Produkten aus Gelen erfolgte mit dem GeneJet™ Gel Extraction Kit.

Hierfür wurde zunächst das Gewicht des zu extrahierenden Gelstücks bestimmt und 1:1 Binde-Puffer hinzupipettiert und für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Isopropanol in gleicher Menge wie die des Binde-Puffers. Die Lösung wurde auf eine Säule überführt und bei Raumtemperatur und 16.089 xg eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und dieser Schritt nach Zugabe von 700 µl Wasch-Puffer wiederholt. Die Säule wurde schließlich in ein neues Röhrchen transferiert und je nach Gelgewicht 30 bis 50 µl Elutions-Puffer hinzu pipettiert. Anschließend wurde erneut 1 Minute bei 16.089 xg zentrifugiert.

4.7 Fällung der Sequenzier-PCR

Nach Zugabe von 1 µl 3M Natriumacetatlösung und 25 µl 96%-igem Ethanol, wurde die Lösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 16.089 xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 25 µl 70%-igen Ethanols hinzugefügt und bei Raumtemperatur und 16.089 xg zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nach Verwerfen des Überstandes wiederholt. Im Speed-Vac erfolgte die Trocknung des Pellets für 20 Minuten.

4.8 Gen-Knockdown in L-428-Zellen

Mit dem Ziel der (teilweisen) Abschaltung des Gens CYP4Z1 wurde ein Klonierungsversuch in L-428-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden zwei unterschiedliche siRNAs in den miR-Vektor kloniert und dieser in die Hodgkin-Zelllinie L-428 transfiziert. Dies wurde mit dem Block-iT Pol II miR RNAi Vectors Kit durchgeführt.

4.8.1 Design und Hybridisierung der siRNA

Die siRNAs wurden mit Hilfe des Block-iT™ RNAi Designer von Invitrogen entworfen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche *top* und *bottom strand* Oligos verwendet.

Es wurde folgender Hybridisierungs-Ansatz pipettiert:

Tabelle 11: Ansatz zur Hybridisierung der siRNAs.

Reagenz	Volumen
200 µM top strand oligo 1/2	5,0 µl
200 µM bottom strand oligo 1/2	5,0 µl
10X Oligo Annealing Buffer	2,0 µl
DNase/RNase-free water	8,0 µl
gesamt	20,0 µl

Die Ansätze 1 und 2 wurden anschließend für 4 Minuten auf 95°C erhitzt und danach bei Raumtemperatur für 10 Minuten abgekühlt. Nachdem die Lösungen gevortext worden waren, folgte eine 1:100 Verdünnung mit DNase/RNase freiem Wasser. Diese Ansätze wurden erneut 1:50 mit 1X Annealing Buffer verdünnt. Die nun vorliegenden 1:5000 Verdünnungen lagen mit einer Konzentration von 10 nM vor.

4.8.2 Klonierung in den miR-Vektor

Für den Klonierungsversuch wurden folgende Ligationsansätze pipettiert:

Tabelle 12: Ligationsansätze.

Reagenz	Volumen
5X Ligation Buffer	4,0 µl
pcDNA™, linearized	2,0 µl
ds Oligo (10 nM) 1/2	4,0 µl
DNase/RNase-free water	9,0 µl
T4 DNA Ligase	1,0 µl
gesamt	20,0 µl

Die Ansätze wurden gevortext, bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

4.8.3 Transformation in *E. coli*

Zwei Passagen von *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut (Lagerung bei -80°C) und je 2 µl des Ligationsansatzes 1 beziehungsweise 2 hinzupipettiert. Nachdem die Lösungen vorsichtig invertiert worden waren, wurden diese 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C wurden die Lösungen erneut auf Eis gestellt und jeweils 250 µl S.O.C. Medium hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde im Schüttler bei 15 g und 37°C. 100 µl des jeweiligen Ansatzes wurden auf vorgewärmte Platten mit LB Medium (50 µl/ml Spectinomycin) ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

4.8.4 Anzüchtung der Plasmide

Je vier Klone von Ansatz 1 und 2 wurden gepickt und in je 10 ml LB-Medium eines 50 ml Zentrifugenröhrchens überführt. Spectinomycin wurde mit einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugegeben. Die Zentrifugenröhrchen wurden über Nacht im Schüttler mit Inkubationshaube bei 37°C und 15 g inkubiert.

4.8.5 Plasmidisolation

Die Plasmidisolation erfolgte mit dem Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas. Die 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden bei 6800 xg für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle folgenden Zentrifugationen wurden bei 16.089 xg durchgeführt. Die Pellets wurden jeweils mit 250 µl der Resuspensionslösung resuspendiert, in je ein 1,5 ml Röhrchen überführt und anschließend je 250 µl Lysis-Puffer hinzugegeben. Nachdem die Röhrchen mehrmals invertiert worden waren, folgte die Zugabe von je 350 µl Neutralisationslösung mit anschließender Zentrifugation für 5 Minuten. Die klare Phase wurde jeweils auf eine Säule überführt und 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgte die Zugabe von 500 µl Wasch-Puffer und eine erneute Zentrifugation für 1 Minute. Der Überstand wurde wieder verworfen und der gesamte Waschschrift noch einmal wiederholt. Um den restlichen Wasch-Puffer zu entfernen wurde erneut für 1 Minute zentrifugiert. Die Säulen wurden auf ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt, jeweils 50 µl des Elutions-Puffers hinzupipettiert und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 2 Minuten. Die DNA-Konzentration wurde mittels Photometer bestimmt.

4.8.6 Transfektion der Plasmid-DNA in L-428-Zellen

Eine Zellkultur der Linie L-428 wurde an Tag 1 1:3 gesplittet und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Hierdurch konnten die Zellen in den Zustand der Proliferation gebracht werden. An Tag 2 wurden die Zellen gezählt. Dafür wurden diese bei 95 xg für 10 Minuten zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau wurden die Zellen jedes Ansatzes mit einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich dabei aus der Zellzahl $\times 10^4 \times$ Verdünnung. Für jeden der drei Ansätze wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert und in je 100 μ l Nucleofactor Solution V resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 2 μ g Plasmid 1 und 2 sowie des Leervektors. Dieser wurde zur Kontrolle transfiziert. Die Elektroporation erfolgte im Programm X-01. Anschließend wurden die Ansätze für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l vorgewärmten RPMI-Medium pro Ansatz, wurden diese in eine 6-Well-Platte mit 3 ml vorgelegten Medium pro Well überführt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. An Tag 3 erfolgte eine erste Beurteilung des Transfektionserfolges mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer Extinktion von 487 nm. Erfolgreich transfizierte Zellen erschienen hierbei grün (Emission bei 509 nm).

4.8.7 FACS-Analyse

Unter FACS (*fluorescence activated cell scanning*) oder Durchflusszytometrie versteht man eine Analysemethode zur Bestimmung funktioneller, qualitativer oder quantitativer Partikelmerkmale in Suspensionen.

Die Zellen wurden zunächst jeweils abzentrifugiert und in 300 μ l PBS resuspendiert. Bei der Analyse der transfizierten L-428-Zellen wurde quantitativ sowohl der Anteil erfolgreich transfizierter Zellen bestimmt als auch deren Anteil lebender Zellen. Dafür wurden die Zellen vor der Analyse mit 3 μ l Propidiumjodid angefärbt.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis der Expression von HERV-Transkripten

5.1.1 PCR mit Primern für die HERV-Familie HERV-H

In vorangegangenen Analysen mittels des *HERV Test* Programmes war auffällig, dass Probe Sets, welche eine Hochregulation in Hodgkin-Lymphomzellen zeigten, besonders häufig benachbart zu Sequenzen lagen, welche eine Homologie zur Familie der HERV-H aufwiesen. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zunächst Primer für das HERV mit der *Retrosearch*-id 8724 (*Retrosearch-Datenbank*) entworfen, da dies den höchsten e-Wert, also die größte Homologie zur vorliegenden genomischen Sequenz zeigte. Mit diesen Primern wurde anschließend eine PCR durchgeführt (siehe Abbildung 4).

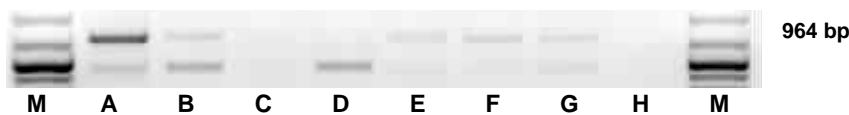


Abbildung 4: PCR mit HERV-H Primern. A = L-428; B = L-1236; C = L-540; D = KM-H2; E = HDLM-2; F = BC330; G = BC332; H = Wasser. Das amplifizierte 964 bp große Transkript konnte als HERV-H_22q11.2 Provirus ancestral Gag polyprotein der Gag_30 Superfamilie identifiziert werden. Außer in L-540 konnte dieses HERV in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

Mittels Sequenzierung der PCR-Produkte aus der Zelllinie L-428 konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um Transkripte von HERV-H handelt. Mittels BLAST Analyse wurde ermittelt, dass es sich bei dem 964 bp großen Produkt um das HERV-H_22q11.2 Provirus ancestral Gag polyprotein der Gag_30 Superfamilie handelt (Sequenz siehe Anhang). Die kürzere Variante zeigte keine Homologie zu diesem HERV. Dies könnte allerdings auch auf die unzureichende Qualität der Sequenzierprobe zurückzuführen sein.

5.1.2 Nachweis ausgewählter Gen-assoziiierter HERV-Familien

Aufbauend auf den positiven Resultaten beim Nachweis von Transkripten der HERV-H Familie (siehe Kapitel 5.1.1) wurden für ausgewählte, Gen-spezifische HERV-Familien mit hohem e-Wert (ermittelt mit *HERV Test* Programm) ebenfalls Primer entworfen. Für das Gen BLM wurde hierbei das assoziierte HERV der Familie ERVL, für FANCD2 HERVK14I, für DKC1 HERV15I, für CYP4Z1 HERV17 und für TRIM24 das HERV

HARLEQUIN amplifiziert. In der Standard PCR waren die in Abbildung 5 gezeigten Produkte nachweisbar.

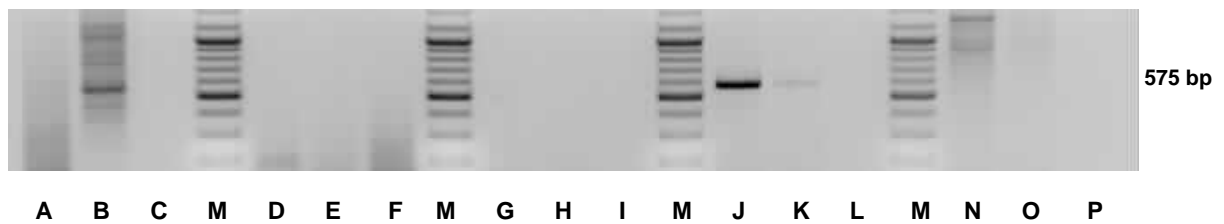


Abbildung 5: PCR mit ERVL, HERVK14I, HERV15I, HERV17 und HARLEQUIN. A = ERVL L-428; B = ERVL BC330; C = ERVL Wasser; D = HERVK14L L-428; E = HERVK14L BC330; F = HERVK14L Wasser; G = HERV15L L-428; H = HERV15L BC330; I = HERV15L Wasser; J = HERV17 L-428; K = HERV17 BC330; L = HERV17 Wasser, N = HARLEQUIN L-428; O = HARLEQUIN BC330; P = HARLEQUIN Wasser. Für HERV ERVL konnte das gesuchte Transkript von 509 bp in RNA aus BC330 amplifiziert werden. Weiterhin sind zahlreiche weitere Transkripte erkennbar, welche allerdings nicht der erwarteten Produktgröße entsprachen.

Mittels Gradienten-PCR wurde versucht die Primerspezifität für ERVL, HERVK14I und HARLEQUIN zu verbessern. Dies führte zu keinem positiven Ergebnis. Die Sequenzierung für HERV17 aus der Zelllinie L-428 (siehe Abb. 5; Spur J) ergab, dass es sich um ein Transkript dieser HERV-Familie handelt. Dies war allerdings nur zu 93% mit der HERV-Sequenz aus der *Retrosearch*-Datenbank identisch. Die Sequenz beinhaltete neben Mutation auch Deletionen und Insertionen (siehe Anhang). Die Sequenz des Produktes von HERVK14I (siehe Abb. 5; Spur D) ergab hingegen kaum Übereinstimmungen mit der Vergleichssequenz für dieses HERV, sodass nicht davon auszugehen ist, dass es sich bei dem amplifizierten Produkt um das vermutete Transkript handelte.

5.1.3 Nachweis der Expression von spezifischen HERV-Transkripten innerhalb der HERV-Region einzelner Gene

Die im Letzten Absatz dargestellten Ergebnisse legten nahe, dass die HERV-Familien, die jeweils Homologe zu den Gen-assoziierten HERV-Regionen beinhalteten, nicht generell in den untersuchten Zellen exprimiert wurden. Es wurde daher untersucht, ob die spezifischen Gen-assoziierten HERV-Regionen exprimiert werden. Hierzu wurden im nächsten Schritt die Analysen des *HERV Test* Programms ausgewertet. Einer Analyse wurden jene Probe Sets unterzogen, welche eine Hochregulation in Hodgkin-Lymphomzellen gegenüber PBMCs zeigten. Das Programm ermittelte alle zu einem Probe Set assoziierten HERV-Regionen in einem Abstand von 0-1000 bp zum Probe Set.

Es wurde anschließend für jedes Gen die HERV Region auf der genomischen DNA betrachtet, in welcher sich besonders viele HERV-Treffer befanden (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Gen-assozierte HERV-Regionen auf der genomischen DNA.

Genname	Assoziierte HERV-Region
BLM	30479-30748
FANCD2	13609-13909
DKC1	10665-10994
CYP4Z1	46216-48048
TRIM24	121965-122214

Für diese Bereiche der genomischen Sequenzen wurden Primer entworfen und Standard PCRs, zunächst nur mit der Hodgkin-Zelllinie L-428 und der PBMC Probe BC330, durchgeführt (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: PCRs mit Gen-assozierten endogenen Retroviren. Es konnten Transkripte der HERV-Regionen für CYP4Z1(1) und CYP4Z1(2) sowie DKC1, BLM, TRIM24 und FANCD2 in der Hodgkin-Zelllinie L-428 und BC330 (außer für HERV CYP4Z1(2)) nachgewiesen werden.

Alle HERV-Transkripte konnten in der Zelllinie L-428 amplifiziert werden. Ebenfalls konnten die jeweiligen Produkte in der PBMC Probe BC330, ausgenommen des HERV-Transkriptes, welches mit den HERV CYP4Z1(2) Primer amplifiziert wurde, nachgewiesen

werden. Die Transkripte wurden aus der Zelllinie L-428 sequenziert und befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

5.1.4 Real-Time-PCR der Gen-assoziierten HERVs

Es wurden RT-PCRs mit den Primern der Gen-assoziierten HERVs durchgeführt. Als Template wurde dabei zunächst nur cDNA der Hodgkin-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 sowie einer Probe von PBMCs (BC330) eingesetzt.

5.1.4.1 CYP4Z1-assoziierte HERVs

Die assoziierte HERV Region des in Hodgkin-Lymphom Zellen hochregulierten Probe Sets besitzt eine Länge von 1832 bp. Daher wurden für diesen Bereich zwei Primerpaare entworfen. Im Folgenden werden die von diesen Primern amplifizierten Produkte als HERV CYP4Z1(1) und HERV CYP4Z1(2) bezeichnet.

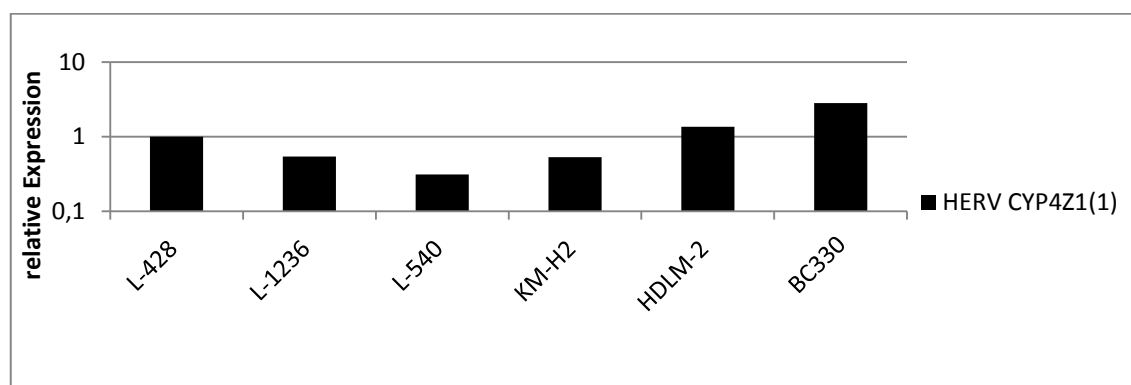


Abbildung 7: RT-PCR des CYP4Z1-assoziierten endogenen Retrovirus (Region 1). Das Transkript konnte in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 und der Probe BC330 des peripheren Blutes nachgewiesen werden.

Die Real-Time PCR für HERV CYP4Z1(1) (siehe Abbildung 7) ergab, dass Transkripte dieses HERVs in alle Zelllinien exprimiert werden. Allerdings war die Expression in allen Hodgkin-Zelllinien geringer als in der untersuchten PBMC Probe.

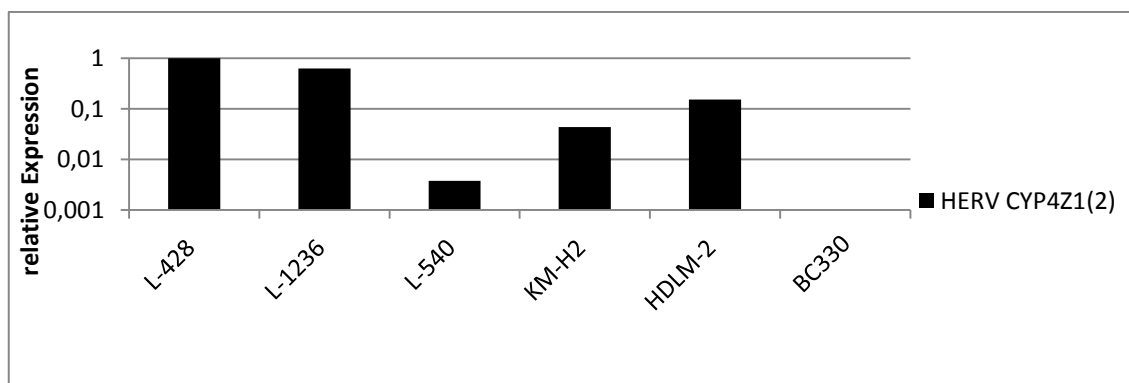


Abbildung 8: RT-PCR des CYP4Z1-assoziierten endogenen Retrovirus (Region 2). Das Transkript konnte in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 nicht aber in der Probe BC330 des peripheren Blutes nachgewiesen werden.

Transkripte für HERV CYP4Z1(2) konnten in allen Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms amplifiziert werden. Dieses Produkt war in der PBMC Probe BC330 nicht nachweisbar (siehe Abbildung 8).

5.1.4.2 FANCD2-assoziiertes HERV

Transkripte für das FANCD2 assoziierte Retrovirus waren in allen untersuchten Zelllinien mittels Real-Time PCR nachweisbar (siehe Abbildung 9). Eine erhöhte Expression in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien konnte gegenüber der PBMC Probe BC330 nur für HDLM-2 gezeigt werden.

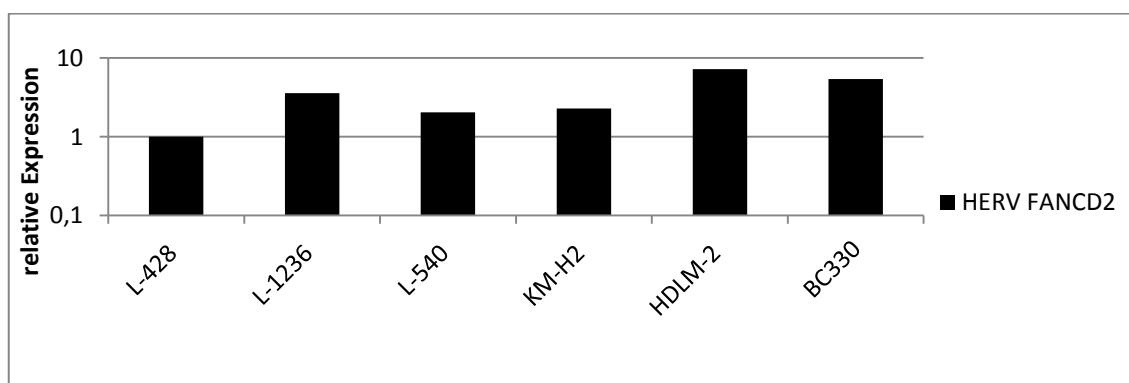


Abbildung 9: RT-PCR des FANCD2-assoziierten endogenen Retrovirus. Das Transkript konnte in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 und der Probe BC330 des peripheren Blutes nachgewiesen werden.

5.1.4.3 BLM-assoziiertes HERV

Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnten auch für das Gen-assoziierte HERV BLM Transkripte in allen untersuchten Zelllinien amplifiziert werden. Der Vergleich der Real-Time PCR-Ergebnisse zeigte keine erhöhte Expression in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien gegenüber PBMCs.

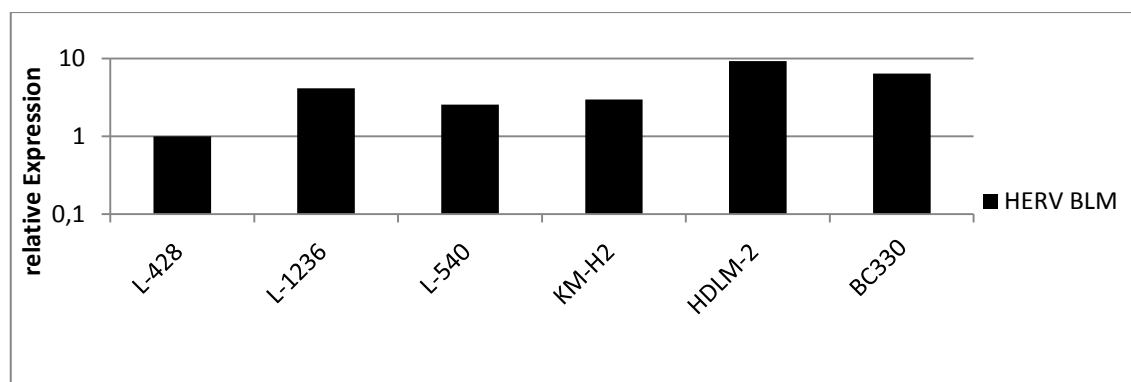


Abbildung 10: RT-PCR des BLM-assoziierten endogenen Retrovirus. Das Transkript konnte in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 und der Probe BC330 des peripheren Blutes nachgewiesen werden.

5.1.4.4 DKC1-assoziiertes HERV

Mittels Real-Time PCR konnten Transkripte für HERV DKC1 amplifiziert werden (siehe Abbildung 11). Auch bei diesem Transkript zeigen sich geringere Expressionswerte bei Hodgkin-Lymphomzellen gegenüber der PBMC Probe BC330.

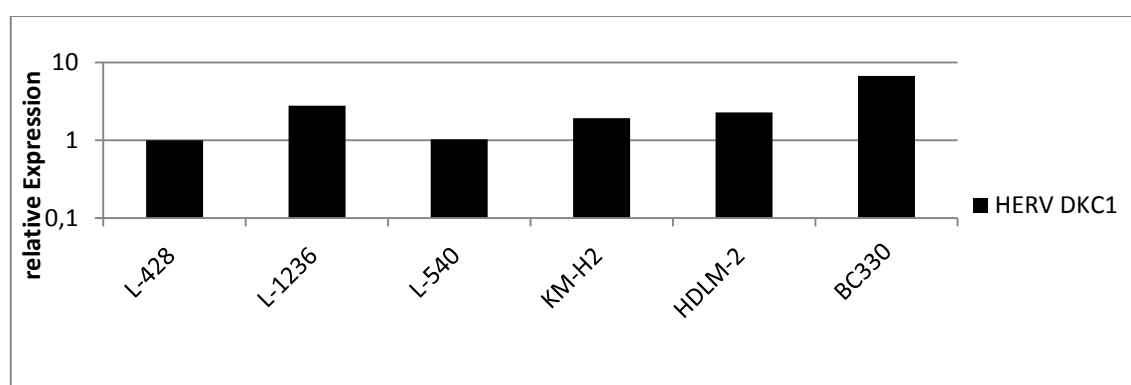


Abbildung 11: RT-PCR des DKC1-assoziierten endogenen Retrovirus. Das Transkript konnte in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 und der Probe BC330 des peripheren Blutes nachgewiesen werden.

5.1.4.5 TRIM24-assoziiertes HERV

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Real-Time PCR für das zu TRIM24 assoziierte HERV-Transkript. Dieses Transkript wurde nur in HDLM-2 geringfügig stärker exprimiert als in der PBMC Probe BC330.

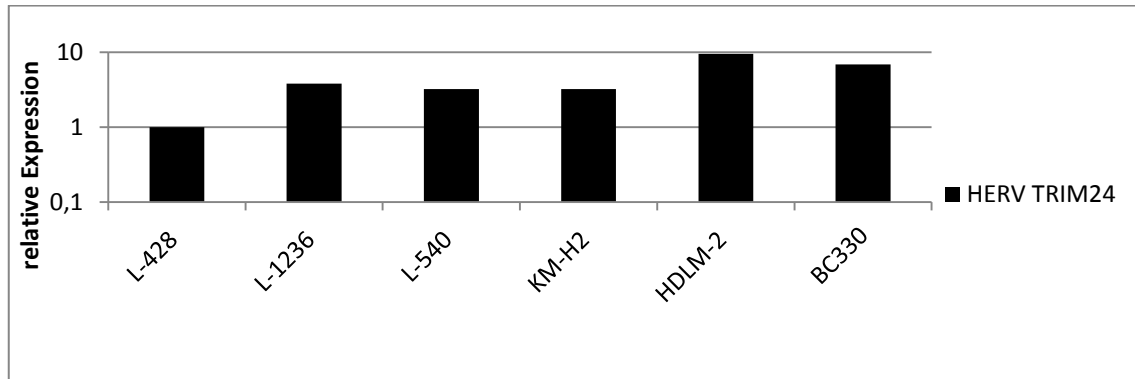


Abbildung 12: RT-PCR des TRIM24-assoziierten endogenen Retrovirus. Das Transkript konnte in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 und der Probe BC330 des peripheren Blutes nachgewiesen werden.

5.2 Sequenzierung Gen-assoziiierter HERVs

Die Sequenzierungen der Gen-assoziierten HERVs ergab, dass es sich bei den PCR-Produkten von HERV CYP4Z1(1) und CYP4Z1(2), HERV FANCD2, HERV BLM, HERV DKC1 und HERV TRIM24 um Transkripte der genomisch kodierten Sequenz der jeweiligen Gene handelt. Aufgrund der Analysen mittels *HERV Test* ist daher anzunehmen, dass es sich dabei um HERV-Transkripte handelt, da in diesen Bereichen der Sequenzen eine hohe Homologie zu diesen HERVs besteht.

5.3 Auswirkung von Östrogen auf die Expression von HERV-Transkripten

Im Kapitel 5.1.3.1 konnte gezeigt werden, dass es zur Expression Gen-assoziiierter HERV-Transkripte kommt. Besonders deutlich waren die Ergebnisse für HERV CYP4Z1(2). Daher wurde eine Standard PCR (siehe Abbildung 13) mit fünf Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-428, L-1236, L-540, KM-H2 und HDLM-2), zwei PBMC Proben (BC330 und BC332), sowie drei lymphoblastoiden Zelllinien (NMIIb, A2+2310 und EREB2-5) durchgeführt. Als Vergleichsbasis diente hierfür die Zelllinie EREB2-5, welche

vier Tage mit Östrogen kultiviert wurde. Die Abkürzung –E steht in den folgenden Kapiteln für Kultivierung ohne Östrogen, +E (T2) für 2 Tage Kultivierung mit Östrogen und +E (T4) für 4 Tage Kultivierung mit Östrogen.



Abbildung 13: PCR mit den Primern für HERV CYP4Z1(2). A = L-428; B = L-1236; C = L-540; D = KM-H2; E = HDLM-2; F = BC330; G = BC332; H = NMIIb; I = A2+2310; J = EREB2-5 +E; K = EREB2-5 -E; L = Wasser. Das Transkript konnte in Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms L-428, L-1236, KM-H2, HDLM-2 und den LCLs NMIIb, A2+2310 und EREB2-5 amplifiziert werden. In der Probe BC330 des peripheren Blutes wurde nur eine sehr schwache Produktbande nachgewiesen.

Produkte dieses HERVs konnten für die Hodgkin-Zelllinien L-1236, KM-H2 und HDLM-2 sowie besonders deutlich für L-428 amplifiziert werden. In PBMCs wird dieses Transkript nur sehr schwach in BC332 exprimiert. Alle lymphoblastoiden Zelllinien exprimieren HERV CYP4Z1(2). Entgegen der Erwartung wird dieses HERV in EREB2-5 ohne Östrogenzugabe stärker exprimiert als nach Kultivierung mit Östrogen.

5.3.1 Expression von HERV-Transkripten in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien nach Östrogenzugabe

Aufbauend auf den Ergebnisse aus Kapitel 5.3 wurden alle Hodgkin-Lymphom-Zelllinien sowie die lymphoblastoiden Zelllinien A2+2310 und EREB2-5 auf Expressionsveränderungen nach Zugabe von Östrogen untersucht. Hierfür wurden die jeweiligen Zellen für vier Tage mit Östrogen kultiviert und anschließend die RNA zur cDNA Gewinnung extrahiert. Die Ergebnisse der Real-Time PCR sind in den Kapiteln 5.3.1.1 bis 5.3.1.5 dargestellt. Die Expressionsrate von L-428-Zellen ohne Östrogenkultivierung wurde jeweils für alle Gene auf 1 gesetzt.

5.3.1.1 L-428

Für die Zelllinie L-428 wurde aufgrund des guten Proliferationszustandes unter Östrogenzugabe eine Kinetik für dessen Einfluss auf die Expression der HERV-Transkripte erstellt. Verglichen wurden die Expressionsraten an Tag 2 und 4 nach Östrogenzugabe.

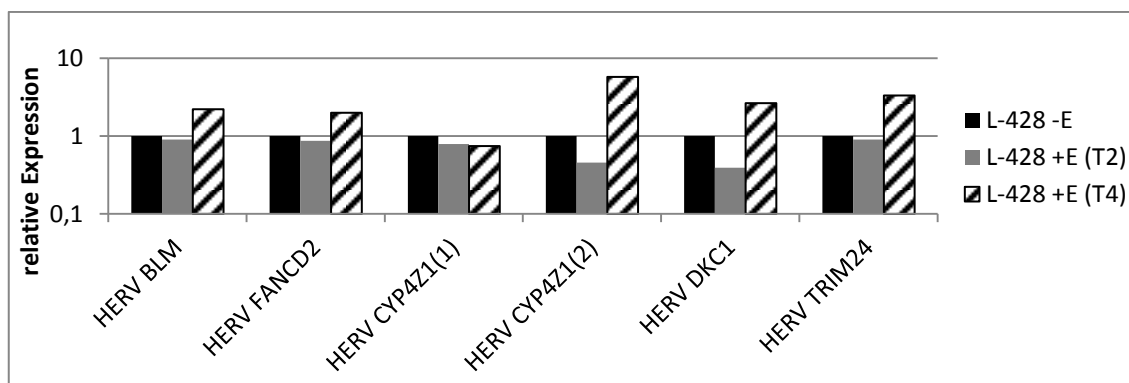


Abbildung 14: HERV Expression in L-428 ohne und mit Östrogen. An Tag 2 nach Östrogenzugabe sank die Expression zunächst leicht ab. An Tag 4 war eine Hochregulation der HERV-Transkripte gegenüber der Expression ohne Östrogen zu beobachten.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Real-Time PCR dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass die Expression aller HERV-Transkripte an Tag 2 nach Östrogenzugabe zunächst leicht absank. An Tag 4 sind höhere Expressionswerte im Vergleich zur Expression ohne Östrogen erkennbar. Davon weicht nur das Transkript für HERV CYP4Z1(1) ab. Hier sank die Expression an Tag 4 noch leicht unter jener an Tag 2. Am deutlichsten war der Anstieg der Expression bei CYP4Z1(2) an Tag 4.

5.3.1.2 L-1236

Die Real-Time PCR der Zelllinie L-1236 ergab, dass diese 4 Tage nach Zugabe von Östrogen eine geringere Expressionsrate von HERV-Transkripten zeigte als ohne Östrogen (siehe Abbildung 15).

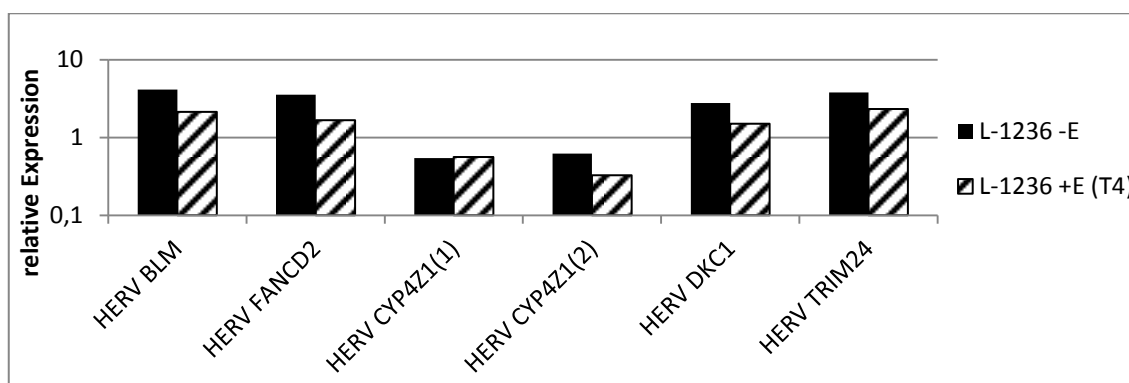


Abbildung 15: HERV Expression in L-1236 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die HERV-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe herunterreguliert.

5.3.1.3 L-540

In Abbildung 16 sind die Expressionsraten der Real-Time PCR für die HERV-Transkripte und in der Zelllinie L-540 dargestellt. Das Transkript HERV CYP4Z1(1) wurde nach 4 Tagen Kultivierung mit Östrogen hochreguliert. Alle anderen HERVs zeigten eine geringere Expressionsrate als ohne Östrogen.

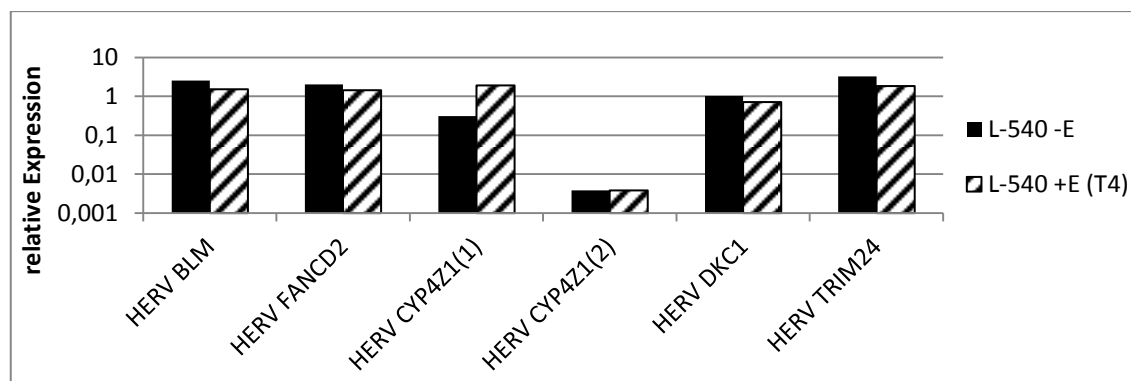


Abbildung 16: HERV Expression in L-540 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die HERV-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe herunterreguliert. Ausnahmen bildeten nur die Transkripte der HERV Regionen für CYP4Z1. Diese wurden schwach hochreguliert.

5.3.1.4 KM-H2

Beide Transkripte der zu CYP4Z1 assoziierten HERVs wurden nach Kultivierung mit Östrogen in KM-H2 hochreguliert. Alle anderen HERV-Transkripte zeigten eine geringere Expression mit Östrogen im Vergleich zur Kultivierung ohne (siehe Abbildung 17).

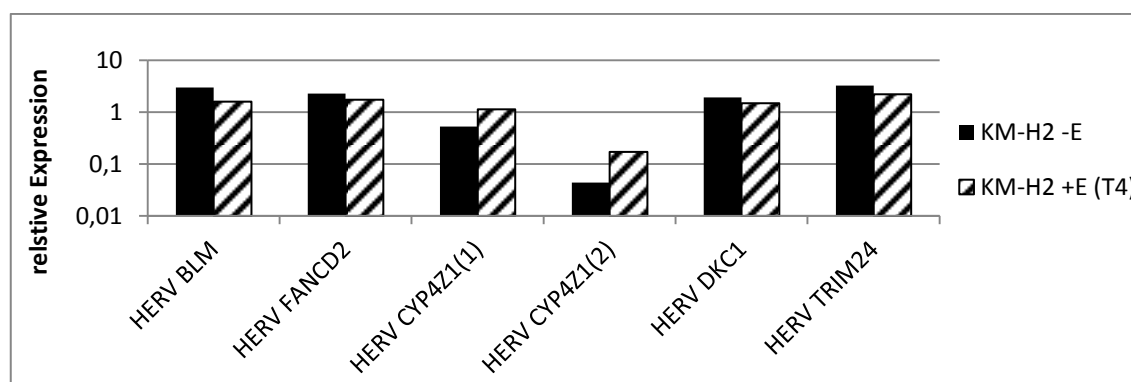


Abbildung 17: HERV Expression in KM-H2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die HERV-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe herunterreguliert. Ausnahmen bildeten nur die Transkripte der HERV Regionen für CYP4Z1. Diese wurden schwach hochreguliert.

5.3.1.5 HDLM-2

In Abbildung 18 ist die Real-Time PCR der Gen-assoziierten HERV-Transkripte in der Zelllinie HDLM-2 dargestellt. Auch in dieser Zelllinie wurden die Transkripte unter Östrogenzugabe runterreguliert. Eine Ausnahme bildete nur das Transkript für HERV CYP4Z1(1). Hier zeigte sich eine geringe Hochregulation.

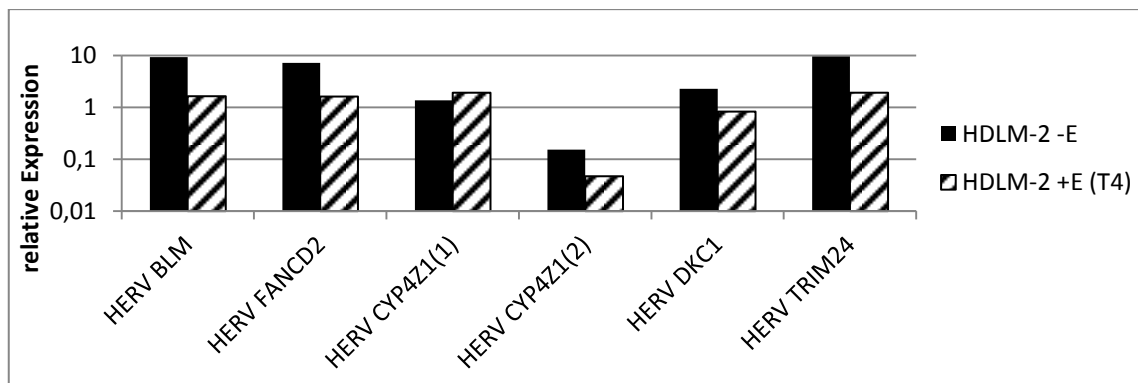


Abbildung 18: HERV Expression in HDLM-2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die HERV-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe herunterreguliert. Eine Ausnahme bildete nur das Transkript für HERV CYP4Z1(1). Dies wurde schwach hochreguliert.

5.3.2 Expression von HERV-Transkripten in lymphoblastoiden Zelllinien nach Östrogenzugabe

Die Ergebnisse der Real-Time PCR der Gen-Transkripte in lymphoblastoiden Zelllinien nach Östrogenzugabe sind in den Kapiteln 5.3.2.1 bis 5.3.2.2 dargestellt. Die Expressionsrate von L-428 ohne Östrogenkultivierung wurde jeweils auf 1 gesetzt.

5.3.2.1 EREB2-5

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, wurden HERV-Transkripte in der Zelllinie EREB2-5 vier Tage nach Östrogenzugabe herunterreguliert.

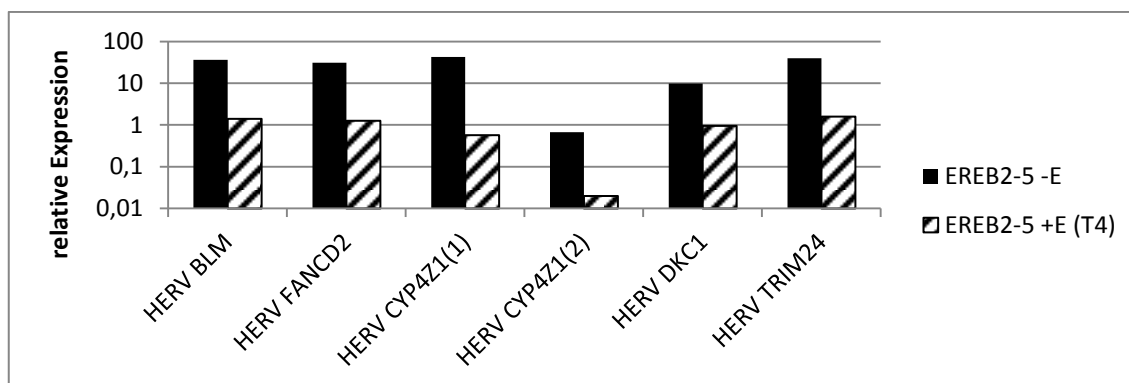


Abbildung 19: HERV Expression in EREB2-5 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die HERV-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe deutlich herunterreguliert.

5.3.2.2 A2+2310

Die Ergebnisse der Real-Time PCR mit HERV-Transkripten und der Zelllinie A2+2310 zeigte eine Runterregulierung dieser Transkripte nach Östrogenzugabe (siehe Abbildung 20).

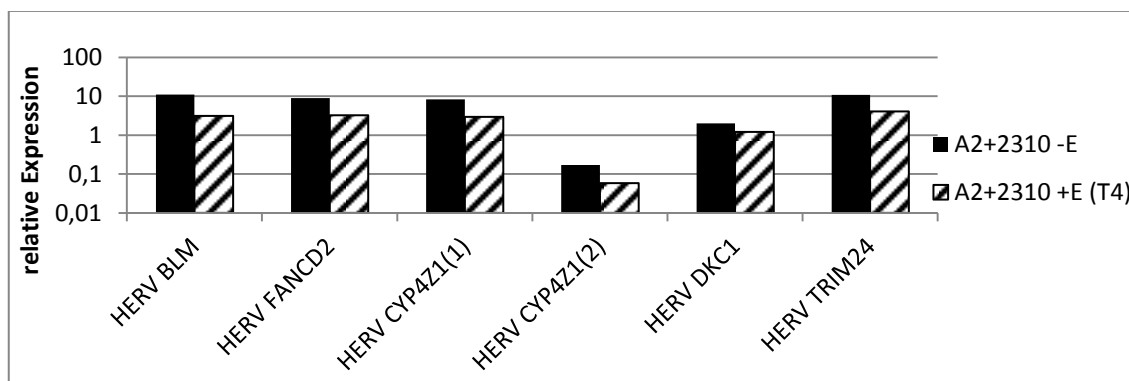


Abbildung 20: HERV Expression in A2+2310 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die HERV-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe herunterreguliert.

5.4 Auswirkung von Östrogen auf die Expression von Gen-Transkripten in ausgewählten Zelllinien

Nachdem bei HERV-Transkripten eine differentielle Expression dieser Transkripte nach Zugabe von Östrogen beobachtet werden konnte, wurden weiterhin die zu diesen HERVs assoziierten Gene betrachtet. Auch hier wurden die Zelllinien vier Tage mit Östrogen kultiviert und anschließend PCRs durchgeführt. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der zunächst durchgeführten Standard PCRs abgebildet. Das Gen c-myc diente als Vergleichsbasis, da hierfür bekannt ist, dass es unter Östrogenzugabe eine Hochregulation zeigt.

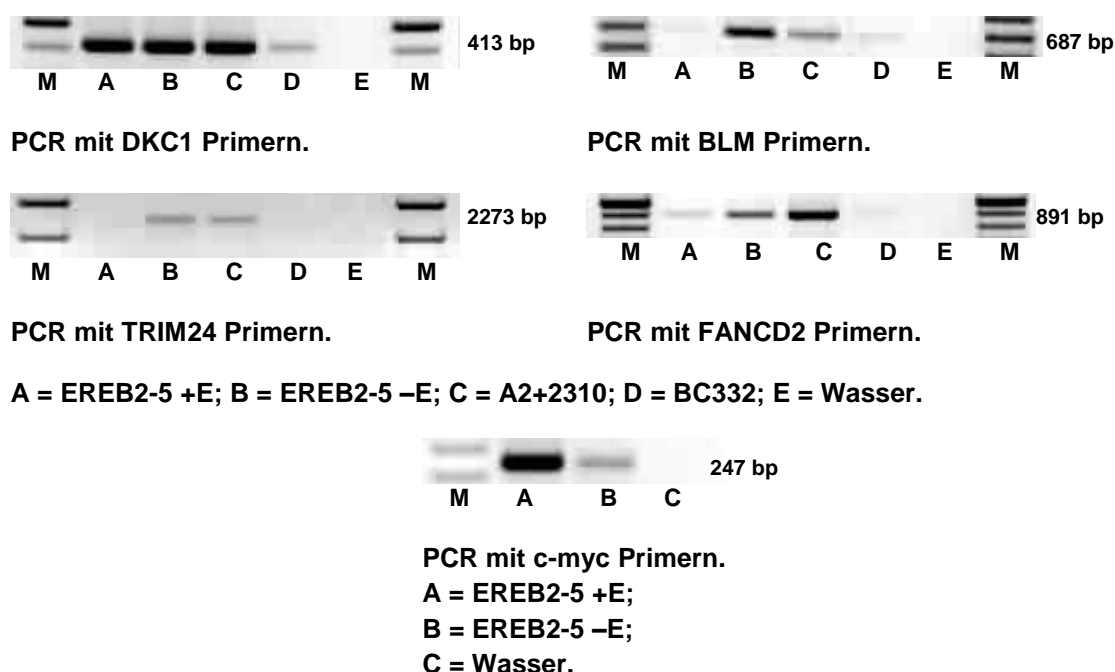


Abbildung 21: PCRs mit den Gen-Primern für DKC1, BLM TRIM24, FANCD2 und c-myc. Untersucht wurden die lymphoblastoiden Zelllinien EREB2-5 (mit und ohne Östrogen) und A2+2310 auf die Expression der genannten Gene.

Auch für das Gen CYP4Z1 wurde eine PCR mit den angegebenen Zelllinien durchgeführt. Hierbei konnten jedoch keine Produkte nachgewiesen werden. In der Zelllinie EREB2-5 mit Östrogen konnten Produkte der Gene DKC1 und FANCD2 nachgewiesen werden. Mit selbiger Zelllinie ohne Östrogen konnten Transkripte für DKC1, BLM, TRIM24 und FANCD2 amplifiziert werden. Gleiches gilt auch für die Zelllinie A2+2310. In BC332 waren nur Transkripte für DKC1 und BLM nachweisbar.

5.4.1 Expression von Gen-Transkripten in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien nach Östrogenzugabe

Die Ergebnisse der Real-Time PCR der Gen-Transkripte in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien nach Östrogenzugabe sind in den Kapiteln 5.4.1.1 bis 5.4.1.5 dargestellt. Die Expressionsrate von L-428 ohne Östrogenkultivierung wurde jeweils auf 1 gesetzt.

5.4.1.1 L-428

Bei der Kultivierung der Zelllinie L-428 mit Östrogen und anschließender Real-Time PCR konnte gezeigt werden, dass Gen-Transkripte stärker exprimiert werden als ohne Östrogen. Bei den Transkripten FANCD2_2, CYP4Z1 und DKC1_1 wurde an Tag zwei nach Östrogenzugabe allerdings zunächst eine geringere Expressionsrate beobachtet (siehe Abbildung 22).

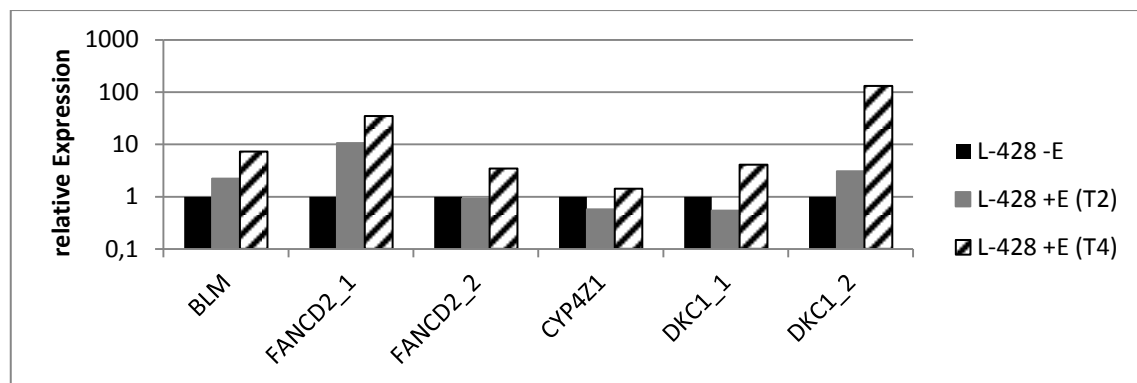


Abbildung 22: Gen-Expression in L-428 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die Gen-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe deutlich hochreguliert.

5.4.1.2 L-1236

Die Real-Time Ergebnisse der Kultivierung der Zelllinie L-1236 mit und ohne Östrogen sind in Abbildung 23 dargestellt. Für die Gen-Transkripte BLM sowie DKC1_1 und DKC1_2 war mit Östrogen eine geringere Expressionsrate zu beobachten. Die Transkripte FANCD2_2 und CYP4Z1 wurden hingegen stark hochreguliert. Bei FANCD2_1 war kein Östrogeneffekt zu beobachten.

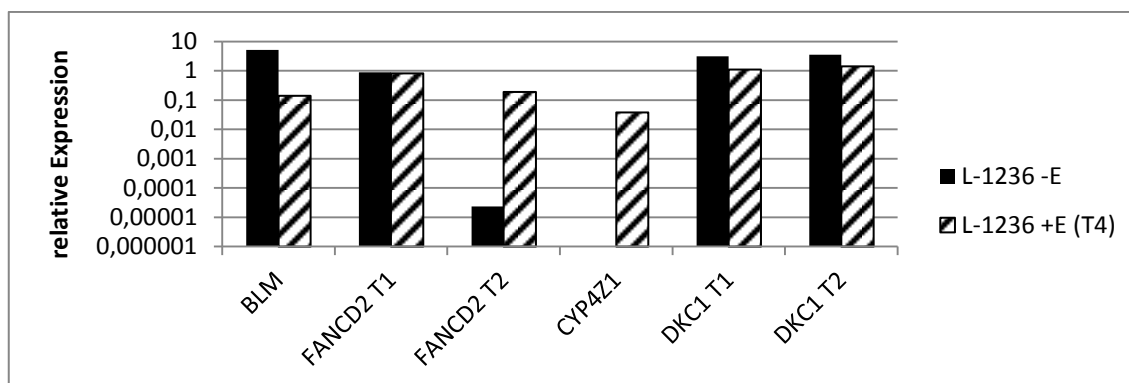


Abbildung 23: Gen-Expression in L-1236 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die Gen-Transkripte BLM, FANCD2_1, DKC1_1 und DKC1_2 wurden nach Östrogenzugabe runterreguliert, die Transkripte FANCD2_2 sowie CYP4Z1 hochreguliert.

5.4.1.3 L-540

In der Zelllinie L-540 wurden alle untersuchten Gen-Transkripte nach Östrogenzugabe hochreguliert (siehe Abbildung 24). Der deutlichste Effekt war für die Transkripte FANCD2_2 und CYP4Z1 zu beobachten.

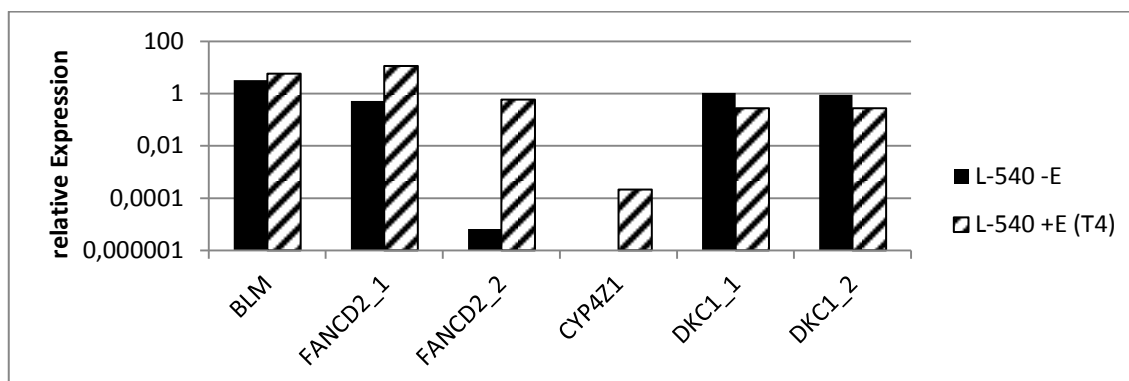


Abbildung 24: Gen-Expression in L-540 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die Gen-Transkripte BLM, FANCD2_1 und FANCD2_2 sowie CYP4Z1 wurden nach Östrogenzugabe hochreguliert, die Transkripte DKC1_1 und DKC1_2 herunterreguliert.

5.4.1.4 KM-H2

Die Gen-Transkripte FANCD2_1 und FANCD2_2 sowie CYP4Z1 wurden nach Kultivierung mit Östrogen in der Zelllinie KM-H2 hochreguliert. Die Transkripte BLM, DKC1_1 und DKC1_2 wurden geringer exprimiert (siehe Abbildung 25).

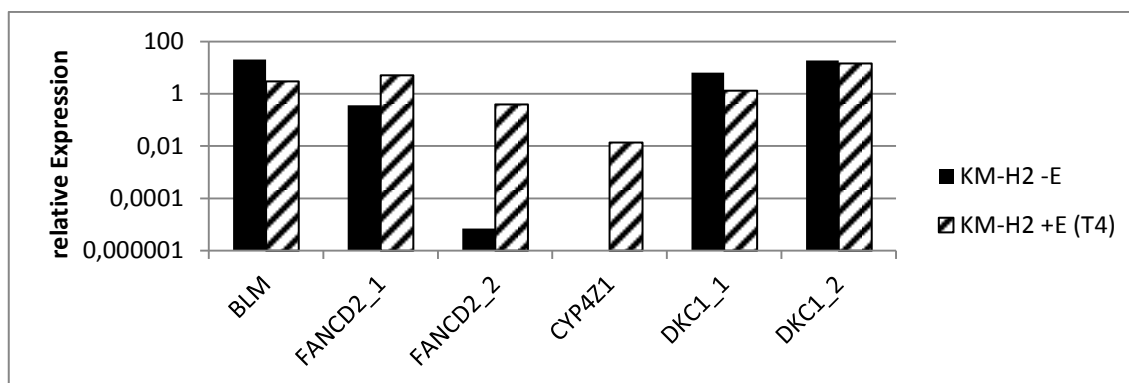


Abbildung 25: Gen-Expression in KM-H2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die Gen-Transkripte BLM, DKC1_1 und DKC1_2 wurden nach Östrogenzugabe runterreguliert, die Transkripte FANCD2_1 und FANCD2_2 sowie CYP4Z1 hochreguliert.

5.4.1.5 HDLM-2

Nach Zugabe von Östrogen sank die Expression der Gen-Transkripte BLM, DKC1_1 und DKC1_2 in der Zelllinie HDLM-2. Weiterhin wurden FANCD2_1 und FANCD2_2 sowie CYP4Z1 bei Kultivierung mit Östrogen hochreguliert. Die Ergebnisse der Real-Time PCR sind in Abbildung 26 dargestellt.

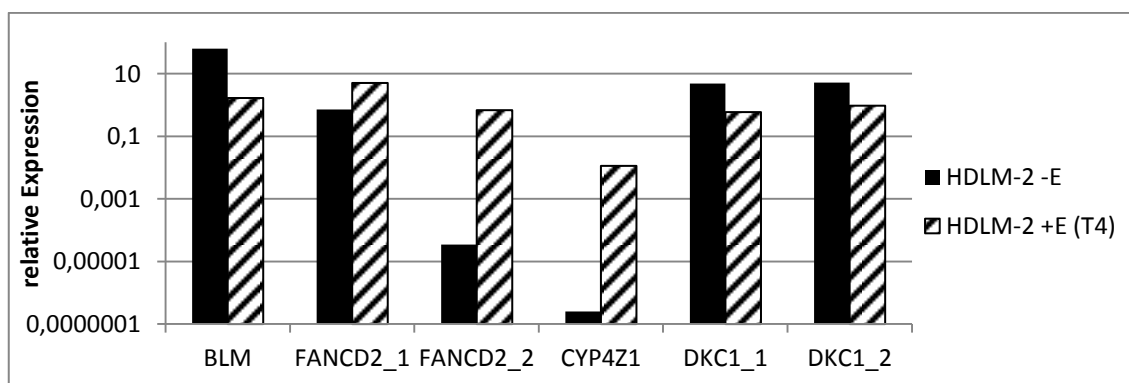


Abbildung 26: Gen-Expression in HDLM-2 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die Gen-Transkripte BLM, DKC1_1 und DKC1_2 wurden nach Östrogenzugabe runterreguliert, die Transkripte FANCD2_1 und FANCD2_2 sowie CYP4Z1 hochreguliert.

5.4.2 Expression von Gen-Transkripten in lymphoblastoiden Zelllinien nach Östrogenzugabe

Die Ergebnisse der Real-Time PCR der Gen-Transkripte in lymphoblastoiden Zelllinien nach Östrogenzugabe sind in den Kapiteln 5.4.2.1 bis 5.4.2.2 dargestellt. Die Expressionsrate von L-428 ohne Östrogenkultivierung wurde jeweils auf 1 gesetzt.

5.4.2.1 EREB2-5

In Abbildung 27 sind die Real-Time PCR Ergebnisse der Zelllinie EREB2-5 mit und ohne Östrogen dargestellt.

Für diese Zelllinie ist bekannt, dass die Zellen nur in Anwesenheit von Östrogen proliferieren (Kempkes et al, 1995).

Das Gen-Transkript CYP4Z1 wurde in EREB2-5 weder mit noch ohne Östrogen exprimiert. Die Transkripte BLM, FANCD2_1 und DKC1_2 wurden erst nach Östrogenzugabe exprimiert. FANCD2_2 und DKC1_1 wurden auch unter Abwesenheit von Östrogen exprimiert, allerdings verstärkt nach Östrogenkultivierung.

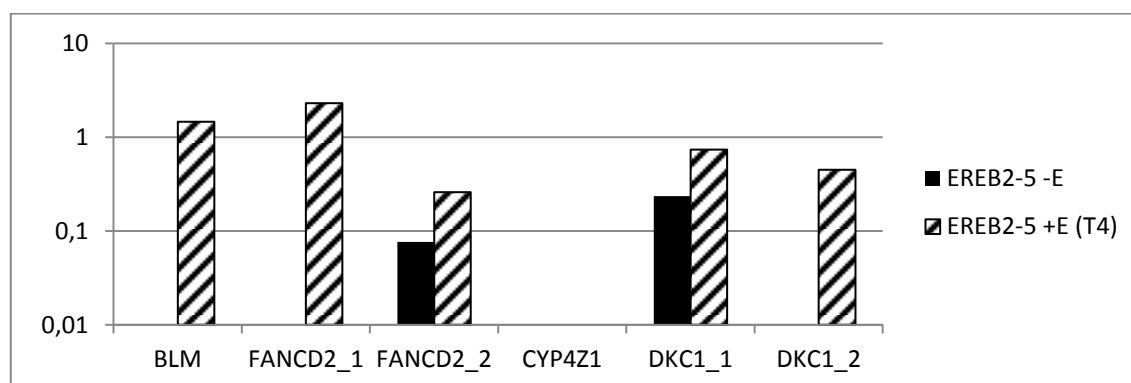


Abbildung 27: Gen-Expression in EREB2-5 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Die Gen-Transkripte BLM, FANCD2_1 und DKC1_2 wurden nur mit Östrogen exprimiert. FANCD2_2 und DKC1_1 wurden nach Östrogenzugabe hochreguliert. CYP4Z1 wurde in EREB2-5 weder ohne noch mit Östrogen exprimiert.

5.4.2.2 A2+2310

In A2+2310 wurden die Gen-Transkripte FANCD2_1 und FANCD2_2 nach Östrogenzugabe stärker exprimiert als ohne Östrogen. Die Expressionswerte für DKC1_1 und DKC1_2 zeigten einen gegenteiligen Effekt. CYP4Z1 wurde in dieser Zelllinie gar

nicht und das Transkript des Gens BLM erst nach Kultivierung mit Östrogen exprimiert. Die Real-Time PCR-Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

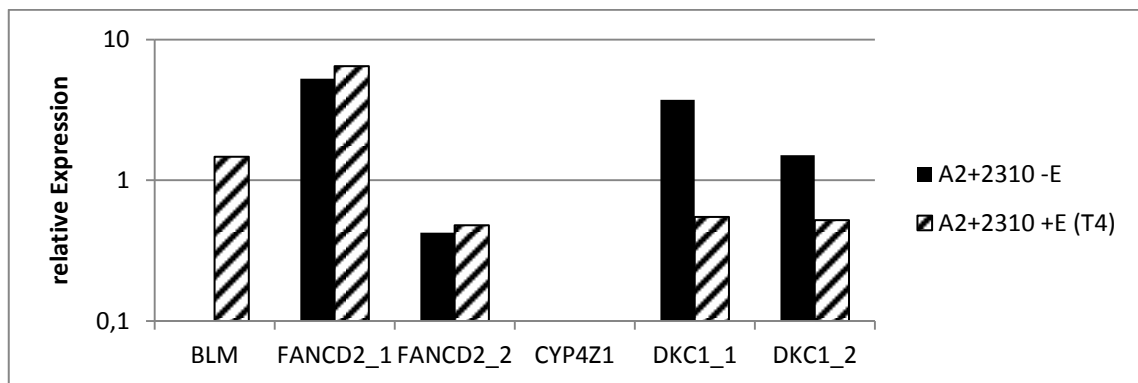


Abbildung 28: Gen-Expression in A2+2310 ohne und mit Östrogen (Tag 4 nach Östrogenzugabe). Das Gen-Transkript BLM wurde nur mit Östrogen exprimiert. FANCD2_1 und FANCD2_2 wurden nach Östrogenzugabe hochreguliert, DKC1_1 und DKC1_2 runterreguliert. CYP4Z1 wurde in A2+2310 weder ohne noch mit Östrogen exprimiert.

5.5 Analysen des Gens CYP4Z1

In Hinblick auf alle durchgeführten Untersuchungen des Gens CYP4Z1 wurde eine Übersicht über Bindungsstellen der verwendeten Primer und der weiter unten beschriebenen miR-Vektorsequenzen erstellt (siehe Abbildung 29).

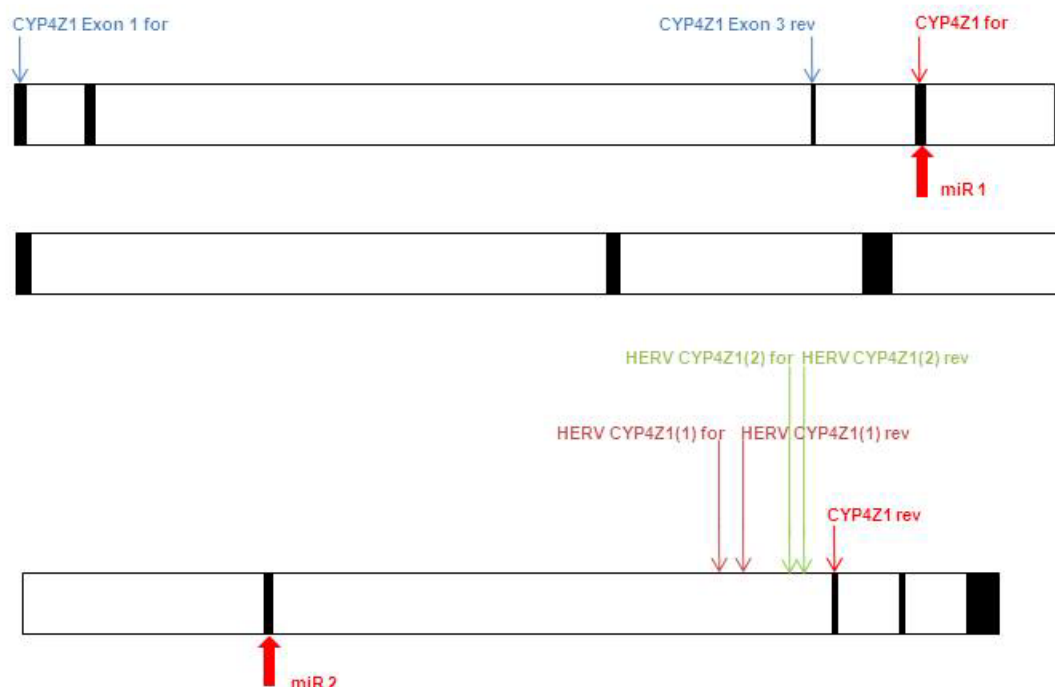


Abbildung 29: Primerbindestellen und miR-Bindesequenzen des Gens CYP4Z1. Schwarze Bereiche kennzeichnen Exons, weiße Bereiche die Introns. Die Bindestellen der verwendeten Primer und miR-Sequenzen wurden mit Pfeilen dargestellt.

5.5.1 Probe Set-Expression von CYP4Z1

Tabelle 14 zeigt alle Probe Sets des Gens CYP4Z1, welche aus der Analyse vorliegender Microarray-Daten hervorgegangen sind. Weiterhin sind zu diesen Probe Sets die jeweiligen Target-Sequenzen sowie die Lokalisation auf der mRNA beziehungsweise das Exon angegeben, welches an das Probe Set bindet. Fett gekennzeichnete Probe Set IDs geben an, dass dieses Probe Set eine Assoziation zu einem endogenen Retrovirus im Abstand von 0 bis 1000 bp aufweist. Unterstrichene Probe Sets sind gegenüber PBMCs in Hodgkin-Lymphom-Zellen hochreguliert. Fett und unterstrichene Probe Sets sind durch beide Merkmale charakterisiert.

Tabelle 14: Probe Set Expression des Gens CYP4Z1.

HERV-Assoziation im Abstand von 0-1000 bpHochregulation gegenüber PBMCs**HERV-Assoziation im Abstand von 0-100 bp und Hochregulation gegenüber PBMCs**

Probe Set ID	Target-Sequenz	Lokalisation auf gen. DNA	
<u>2335015</u>	5'ttttgaagcccagtggtgccagggggcatctccttt gtgtttatgagagacctgcatt ctccctggctcagttctctcaggctctccaga	4892-4983	
Probe Set ID	Target-Sequenz	Lokalisation auf mRNA	Exon
<u>2335016</u>	5'tcctggcttcaggaactcatggctcacccttcttgct gctgatcctcctctgcatgtct ctgctgctgt	13-82	1
<u>2335017</u>	5'gtaatcaggtgtaccagaggaggatggatgatc agagccctgcacctgtttctgca cccctgcccactgggtctatggccacaaggag	88-180	1
<u>2335018</u>	5'cttgtgggttgaccctttacgatgttcttca	246-277	2
<u>2335027</u>	5'atcccaaaagtgcgttagccacaaaatccttgaatc ctgggttg	323-367	3
<u>2335028</u>	5'cgaggacttgtaccctggatggttctaaatggaaa aagcaccgccagattgtgaaacct ggcttcaacatcagcattctgaaaatattcatccatg atg	370-471	4
<u>2335030</u>	5'tgggaggaacacattgcccaaaactcacgtctggag ctcttcaacatgtctccctgatg ac	502-563	5
<u>2335031</u>	5'ccctggactcatacctgaaagcagtggttaaccttag caaaatctccaaccagcgcatga acaattttctacatcacaacgacctggtttcaaattcag ctctcaaggccaaatcttt cta	623-745	6
<u>2335032</u>	5'agtaatccaggaccggaaggagtctcttaaggataa gctaaaacaagatactactc	780-835	7
<u>2335033</u>	5'ggacatgacaccacatccagtgtatctcctgga	946-979	8
<u>2335034</u>	5'atgtgcatcaaggaatgcctccgcctctacg	1102-1132	9
<u>2335035</u>	5'tagtaaacatatcccgttactcgacaa	1139-1166	9
<u>2335042</u>	5'ctgtgtttatcaatatttgggctct	1211-1235	10
<u>2335044</u>	5'cccttgagattctccagggaattctgaaaaatac atccctatgccttcataccattc tcagtggatta	1279-1350	11
<u>2335046</u>	5'ctccgcttaagctggctccagaccactcaaggcctc cccagcctgttcgtcaagttgtc ctcaa	1414-1478	12

<u>2335047</u>	5'aggatacttctgactggtttgacatccattaacagta attttaatttcttctgtatc tggtgaaaccacaaaaacacctgaaaaaactcaagc tgacttcactgcgaagggaaat tattggtttgtaactagtggtagagtggctttcaagca tagtttgatcaaaactccac tcagtatctgcattacttta	1637-1837	12
----------------	---	-----------	----

Alle Probe Sets des Gens CYP4Z1 zeigten in Hodgkin-Lymphomzellen eine Hochregulation. Weiterhin sind ein Viertel dieser Probe Sets assoziiert zu einem endogenen Retrovirus.

5.5.2 Bestimmung des Transkriptionsstartes von CYP4Z1

5.5.2.1 SMART-PCR

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartes des Gens CYP4Z1 wurde eine SMART-PCR durchgeführt. Bei dieser Methode wird am 5'-Ende ein Extension Primer angehängt. Somit ist die Amplifikation des kompletten Transkriptes möglich. Es wurden unterschiedliche Reaktionsansätze auf Produkte überprüft (siehe Abbildung 30).

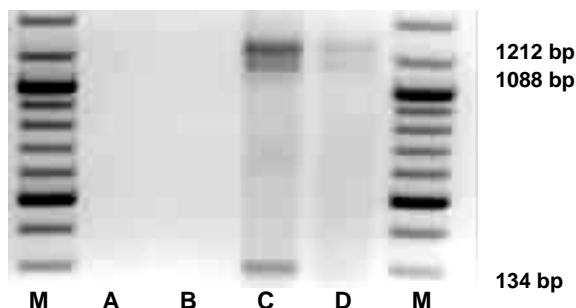


Abbildung 30: SMART-PCR mit CYP4Z1 zur Bestimmung des Transkriptionsstartes. A = L-428 Oligo d(T) Primer/Ampli Taq Gold; B = L-428 CDS IIA Primer/Ampli Taq Gold DNA Polymerase; C = L-428 Oligo d(T) Primer/GoTaq DNA Polymerase; D = L-428 CDSIIA Primer/GoTaq DNA Polymerase. Die Produkte, welche mit dem Ansatz Oligo d(T) Primer und GoTaq DNA Polymerase amplifiziert wurden, wurden sequenziert.

Mit Oligo d(T) Primer für die Erststrangsynthese und GoTaq DNA Polymerase bei der PCR konnten die deutlichsten Ergebnisse gewonnen werden. Es waren drei Produkte nachweisbar, welche im Anschluss sequenziert wurden (Sequenzen siehe Anhang). Hierbei wurde festgestellt, dass es sich bei allen drei Produkten um Transkripte des Gens CYP4Z1 handelt. Die längste Variante mit 1212 bp wurde dabei als Transkript von Exon 1-10 identifiziert (im Folgenden als SMART_A bezeichnet) und das kürzere Produkt mit 1088 bp als homologes Transkript zur ersten Variante, bei welchem Exon 2 fehlte (im Folgenden als SMART_B bezeichnet). Bei der kurzen Variante mit 134 bp handelt es sich um ein Transkript, welches Exon 10 und einen Teil der davor befindlichen HERV-Region amplifizierte (im Folgenden als SMART_C bezeichnet). Die Sequenziererergebnisse sind in Kapitel 5.5.4 visualisiert.

5.5.2.2 PCR mit Transkript-spezifischen Primern

Um festzustellen, ob bei der Expression des Gens CYP4Z1 mehrere Transkripte amplifiziert werden, wurden Primer entworfen, welche sich in Exon 1 (vorwärts Primer) und Exon 3 (rückwärts Primer) befanden. Die PCR mit diesen Primern zeigte in den Zelllinien L-428 und L-1236 zwei Produktbänder (siehe Abbildung 31).

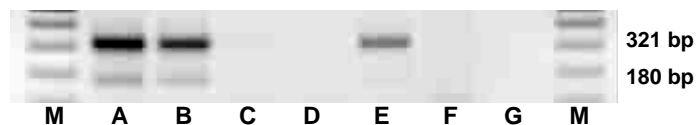


Abbildung 31: PCR mit CYP4Z1. A = L-428; B = L-1236; C = L-540; D = KM-H2; E = HDLM-2; F = BC330; G = Wasser. Der vorwärts Primer bindet in Exon 1, der rückwärts Primer in Exon 3. Es konnten zwei Transkripte amplifiziert werden.

Aufgrund des amplifizierten SMART_C Produktes, welches einen Teil der HERV Region vor Exon 10 einschloss, wurde vermutet, dass dieses HERV möglicherweise einen alternativen Promotor darstellt. Es wurde eine PCR mit vorwärts Primer HERV CYP4Z1(2) und rückwärts Primer CYP4Z1 durchgeführt, um dieses Produkt auch mittels dieser PCR Methode nachzuweisen. Wie aus Abbildung 32 ersichtlich, konnte das vermutete Transkript in den Zelllinien L-428, L-1236 und HDLM-2 nachgewiesen werden.



Abbildung 32: PCR mit vorwärts Primer für HERV CYP4Z1(2) und rückwärts Primer für CYP4Z1. A = L-428; B = L-1236; C = L-540; D = KM-H2; E = HDLM-2; F = BC330; G = BC332; H = Wasser. Das Transkript konnte in L-428, L-1236 und HDLM-2 nachgewiesen werden.

5.5.3 Nachweis der Expression des Pseudogens von CYP4Z1 (CYP4Z2P)

Aufgrund der Recherche in den Datenbanken des NCBI fiel auf, dass ein Pseudogen für CYP4Z1 bekannt ist. Aufgrund der hohen Homologie dieses Gens zum Pseudogen wurde beim Primerdesign der vorwärts Primer von CYP4Z1 übernommen und der rückwärts Primer in einen Bereich gelegt, der sich in drei Basenpaaren zu CYP4Z1 unterschied. Somit konnte die Spezifität zu CYP4Z2P erhöht werden. Die PCR des Pseudogens ist in Abbildung 33 dargestellt (Sequenz siehe Anhang).



Abbildung 33: PCR mit CYP4Z2P. A = L-428; B = L-1236; C = L-540; D = KM-H2; E = HDLM-2; F = BC330; G = Wasser. Die Sequenzierung ergab, dass es sich um ein CYP4Z2P Transkript handelt. Analog zum CYP4Z1 Transkript war CYP4Z2P nur in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, außer L-540, nachweisbar.

Zum Vergleich mit der Expressionsrate des Gens CYP4Z1 wurde eine Real-Time PCR mit diesem Gen und dem Pseudogen CYP4Z2P durchgeführt (siehe Abbildung 34).

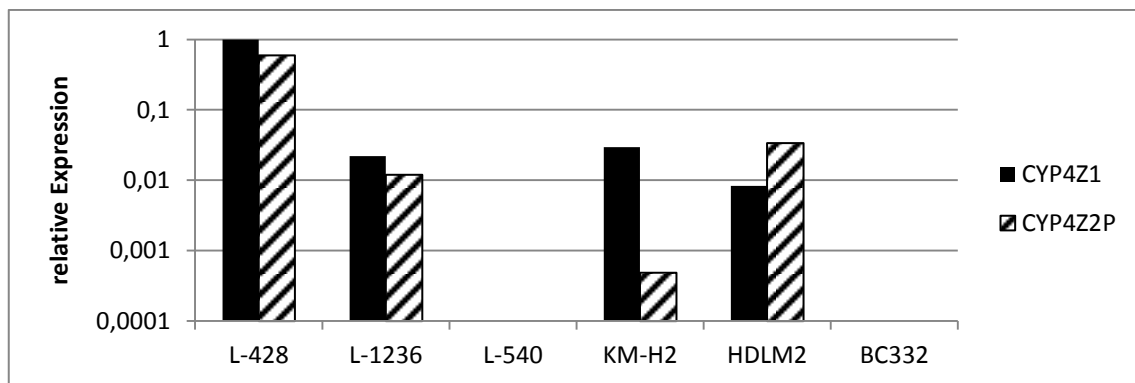


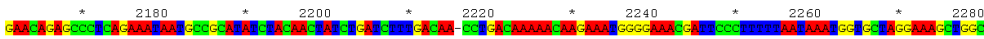
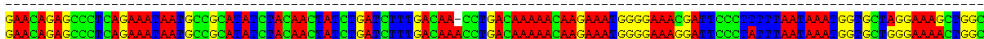

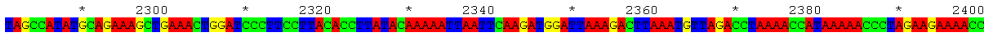
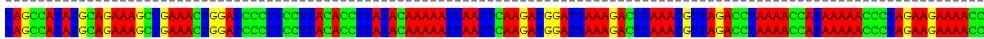




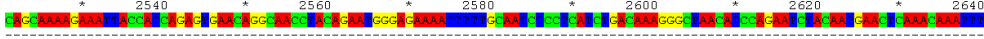

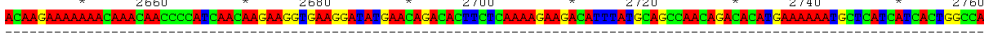

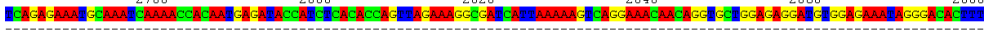
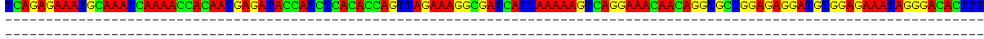

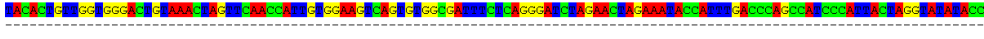

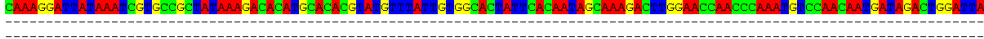


Abbildung 34: Real-Time PCR mit Primern für CYP4Z2P. Dieses Transkript konnte (ebenso wie in CYP4Z1) in L-428, L-1236, KM-H2 und HDLM-2 nachgewiesen werden und wurde nur in HDLM-2 stärker exprimiert als in CYP4Z1.

Das Pseudogen CYP4Z2P wurde ebenso wie das Gen CYP4Z1 nur in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, ausgenommen L-540, exprimiert. In L-428, L-1236 und KM-H2 wurde CYP4Z2P geringer und in HDLM-2 höher exprimiert als CYP4Z1.

5.5.4 Vergleich der Sequenzen von CYP4Z1 mit GeneDoc

Mit der Software *GeneDoc* wurden alle Sequenzen des Gens CYP4Z1 verglichen. In die Darstellung einbezogen (siehe Abbildung 35) sind Teile der genomischen Sequenz aus der *Gene* Datenbank des NCBI sowie die mRNA-Sequenz, welche als Referenz dient. SMART_A, SMART_B und SMART_C sind die Sequenzen, welche mittels SMART-PCR amplifiziert und sequenziert wurden (siehe Kapitel 5.5.2.1). Die Sequenz „HERV Test“ umfasst die Sequenz des Bereiches der HERV Region, welches mittels der Software *HERV Test* vorhergesagt wurde. HERV(1) und HERV(2) zeigen die sequenzierten Produkte, die mit den Primern HERV CYP4Z1(1) und HERV CYP4Z1(2) amplifiziert wurden. HERV(2)b zeigt das Sequenzierergebnis aus der Zelllinie L-428 der Abbildung 30 (Kapitel 5.5.2.2). Weiterhin wurde der amplifizierte und sequenzierte Bereich des Pseudogens von CYP4Z1 eingetragen, bezeichnet mit dem Namen dessen, CYP4Z2P. Bereiche mit N kennzeichnen eingefügte Lücken.

genomisch	20	40	60	80	100	120	120
mRNA_Ref							-
SMART_A							72
SMART_B							91
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							-
genomisch	140	160	180	200	220	240	240
mRNA_Ref							-
SMART_A							-
SMART_B							-
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							-
genomisch	260	280	300	320	340	360	360
mRNA_Ref							50
SMART_A							-
SMART_B							-
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							-
genomisch	380	400	420	440	460	480	480
mRNA_Ref							170
SMART_A							156
SMART_B							175
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							-
genomisch	500	520	540	560	580	600	591
mRNA_Ref							281
SMART_A							267
SMART_B							186
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							-
genomisch	620	640	660	680	700	720	693
mRNA_Ref							383
SMART_A							369
SMART_B							245
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							-
genomisch	740	760	780	800	820	840	809
mRNA_Ref							499
SMART_A							485
SMART_B							361
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							99
genomisch	860	880	900	920	940	960	924
mRNA_Ref							614
SMART_A							600
SMART_B							476
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							214
genomisch	980	1000	1020	1040	1060	1080	1035
mRNA_Ref							725
SMART_A							711
SMART_B							587
SMART_C							-
HERVTest							-
HERV (1)							-
HERV (2)							-
HERV (2) b							-
CYP422P							325

genomisch		2198
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		610
HERV (1)		202
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		2318
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		730
HERV (1)		322
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		2438
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		850
HERV (1)		389
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		2558
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		970
HERV (1)	-----	-
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		2678
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		1090
HERV (1)	-----	-
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		2798
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		1210
HERV (1)	-----	-
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		2918
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		1330
HERV (1)	-----	-
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		3038
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		1450
HERV (1)	-----	-
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-
genomisch		3158
mRNA_Ref	-----	-
SMART_A	-----	-
SMART_B	-----	-
SMART_C	-----	-
HERVTest		1570
HERV (1)	-----	-
HERV (2)	-----	-
HERV (2) b	-----	-
CYP422P	-----	-

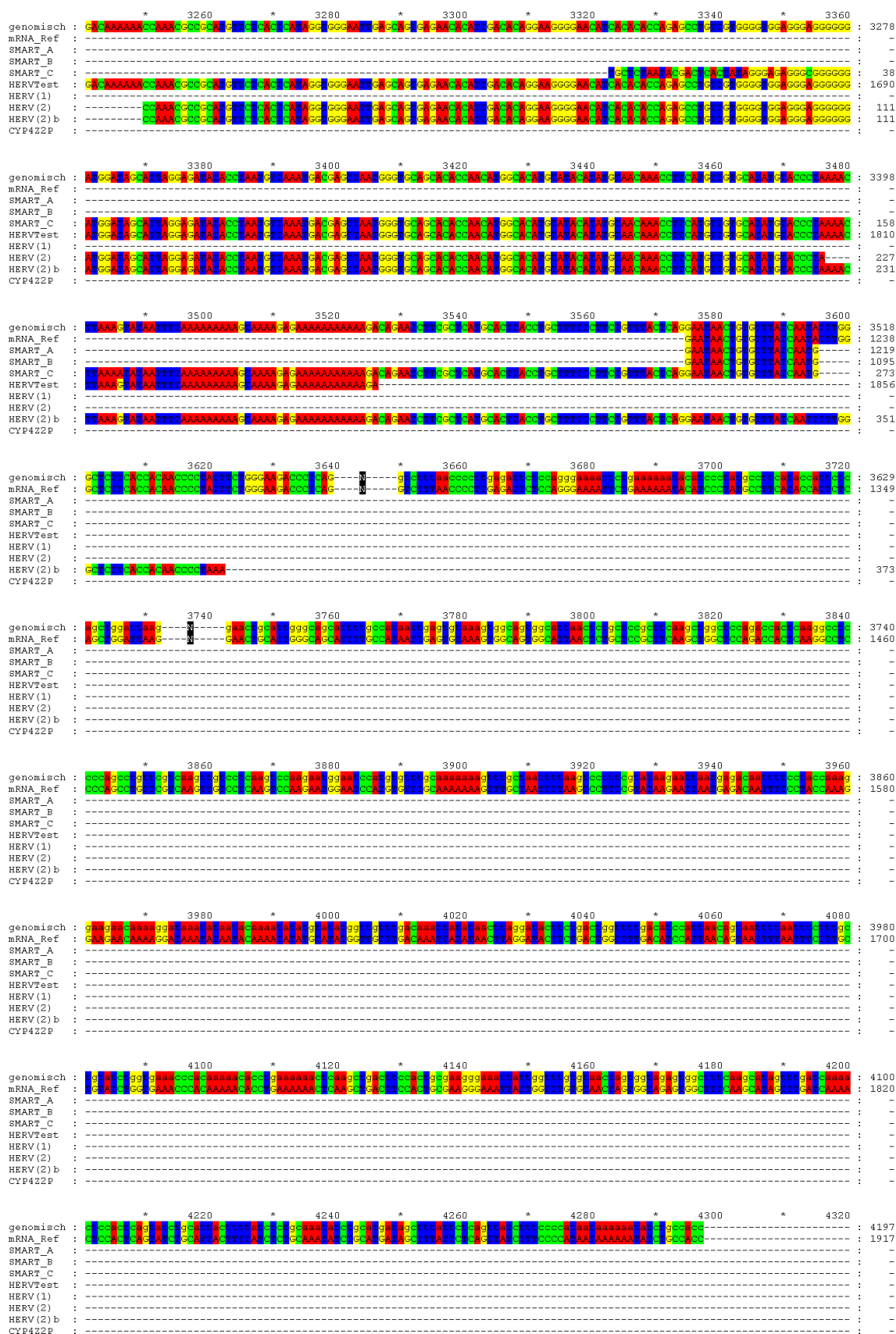


Abbildung 35: Vergleich aller Sequenzen von CYP4Z1. In die Darstellung einbezogen sind die Sequenz der genomischen Sequenz, die mRNA (mRNA-Ref) , SMART_A, SMART_B und SMART_C, die Sequenz „HERV Test“, HERV(1) und HERV(2), HERV(2)b sowie CYP4Z2P.

Für die Sequenzen SMART_A, SMART_B, SMART_C, HERV(1) und HERV (2)b sowie CYP4Z2P konnten Insertionen, Deletionen und Mutationen festgestellt werden.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden die unterschiedlichen Transkripte für CYP4Z1, SMART_A und SMART_B zur Veranschaulichung in Abbildung 36 dargestellt. Die Sequenzen der einzelnen Transkripte befinden sich im Anhang.

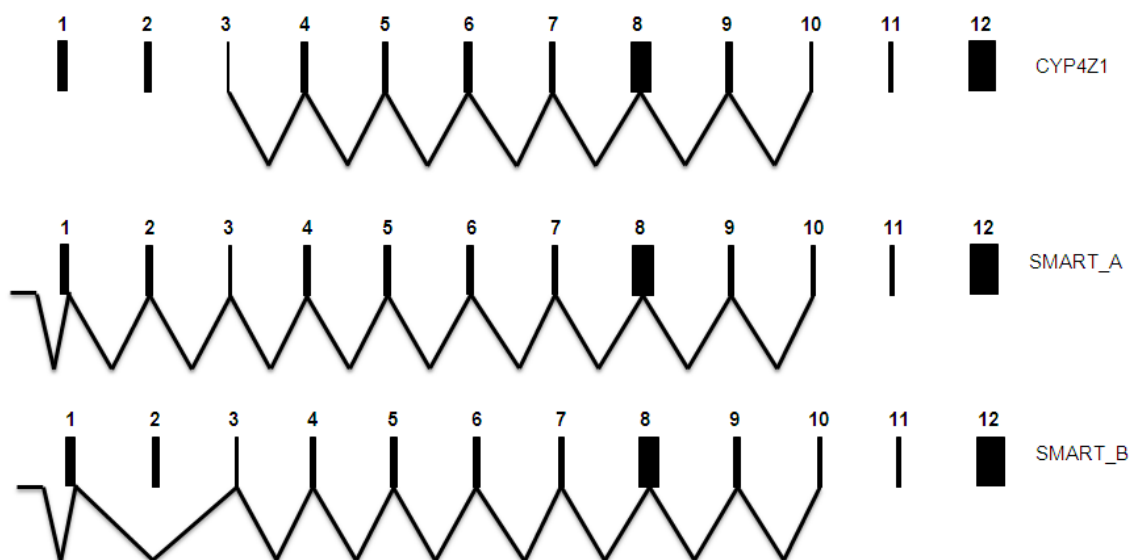


Abbildung 36: Gen-Transkripte von CYP4Z1. Dargestellt sind translatierte Bereiche, welche in der vorliegenden Arbeit mittels Sequenzierung nachgewiesen werden konnten. Dazu gehören neben CYP4Z1 auch SMART_A und SMART_B.

In Abbildung 36 sind die translatierten Bereiche von CYP4Z1, SMART_A und SMART_B dargestellt. Für das Gen CYP4Z1 konnte mittels Sequenzierung der Bereich zwischen Exon 3 und Exon 10 ermittelt werden, welcher ein Transkript darstellte. Bei SMART_A wurden zusätzlich Exon 1 und 2 sowie ein Bereich der genomischen Sequenz vor Exon 1 mit translatiert. Bei SMART_B konnte eine homologe Sequenz zu SMART_A ohne Exon 2 nachgewiesen werden.

5.5.5 Gene korrelierender Expression zu CYP4Z1

Die vorliegenden Microarray-Daten wurden mittels des Pearson Korrelationskoeffizienten nach Genen gefiltert, deren Expression am stärksten mit der des Gens CYP4Z1 übereinstimmt. In Tabelle 15 sind die 10 Gene mit der größten Übereinstimmung aufgeführt.

Tabelle 15: Zur Expression von CYP4Z1 korrelierende Gene.

Gen-Symbol	Korrelationskoeffizient
SH2D1B	0,84862246
ETNK1	0,78175654
CD58	0,77997798
MCM10	0,77229162
CYP19A1	0,77224035
IFIH1	0,76042715
ATAD2	0,75494397
SAMSN1	0,74980275
IRAK1BP1	0,74825664
EPAG	0,74737233

5.5.6 Knockdown von CYP4Z1 in L-428

Zum Knockdown von CYP4Z1 wurde ein mir-Vektor entwickelt. Um zu überprüfen, ob die Transformation erfolgreich und der Vektor korrekt in das Plasmid eingebaut wurde, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt (siehe Abbildung 37). Der pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR Vektor ist 5699 bp groß. Als Kontrolle diente pMaxTM. Es konnte somit sichergestellt werden, dass ein korrekter Einbau in den Vektor erfolgt war. Dieses Ergebnis konnte auch mittels einer Vektorsequenzierung bestätigt werden.

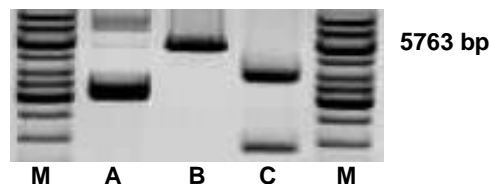


Abbildung 37: Restriktionsverdau Vektor miR 1. A = Vektor unverdaut; B = Vektor miR 1 nach Restriktionsverdau; C = Kontrolle Vektor pMaxGFPTM.

5.5.6.1 Beurteilung des Transfektionserfolges mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zunächst war auffällig, dass sich bei allen Ansätzen schleimige Ansammlungen von Zellen gebildet hatten. Nach Beurteilung mit dem Mikroskop bestanden diese Ansammlungen aus vorwiegend toten Zellen.

An Tag zwei nach der Transfektion der miR-Vektoren in die Zelllinie L-428 wurde der Transfektionserfolg mittels Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die dabei entstandenen Aufnahmen sind in Abbildung 38 dargestellt.

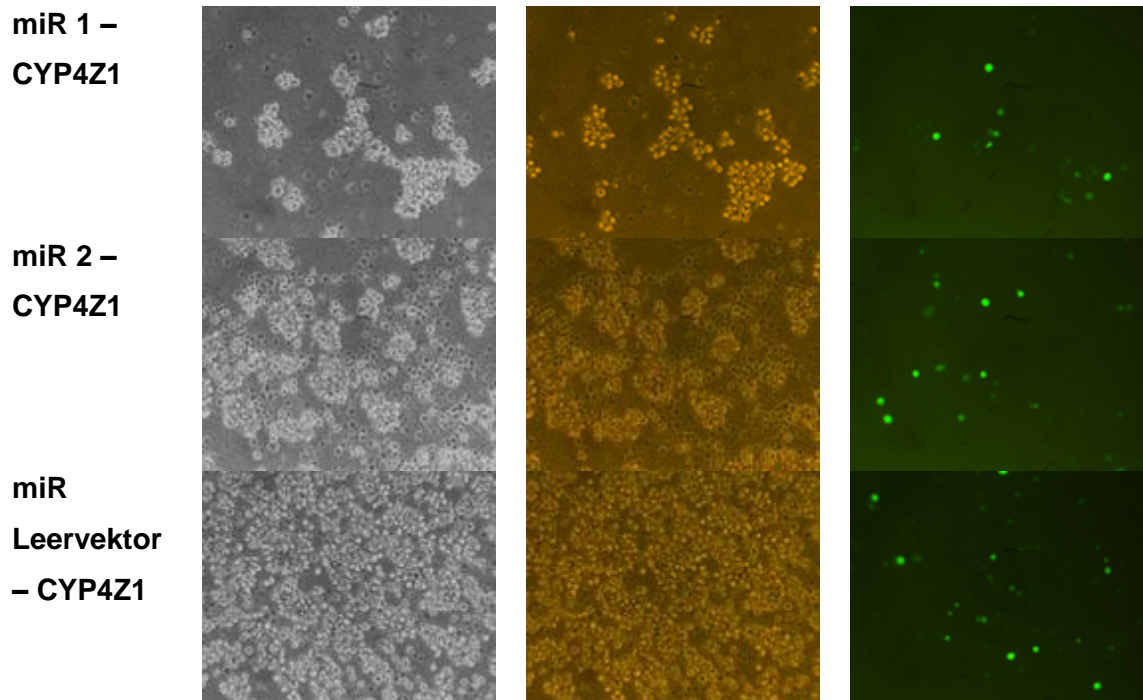


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopie an Tag 2 nach Transfektion. Das linke und das mittlere Bild zeigen jeweils die Aufnahme im Phasenkontrast. Rechts sind die Fluoreszenzaufnahmen abgebildet. Grüne Punkte zeigen erfolgreich transfizierte Zellen.

Neben den beiden Aufnahmen im Phasenkontrast wurde eine Fluoreszenzaufnahme gemacht. Dafür wurden die Zellen mit blauem Licht angeregt. Erfolgreich transfizierte Zellen erscheinen dabei grün. Wie aus der Abbildung erkenntlich, konnte der Leervektor am erfolgreichsten transfiziert werden, gefolgt von miR 2 und miR 1.

5.5.6.2 Auswertung des Transfektionsergebnisses mittels FACS-Analyse

Die Ergebnisse der FACS-Analysen der Transfektionsversuche 1 und 2 sind im Diagramm in Abbildung 39 dargestellt. Es wurde die Transfektionseffizienz und der Anteil von lebenden Zellen bestimmt, welche erfolgreich transfiziert wurden.

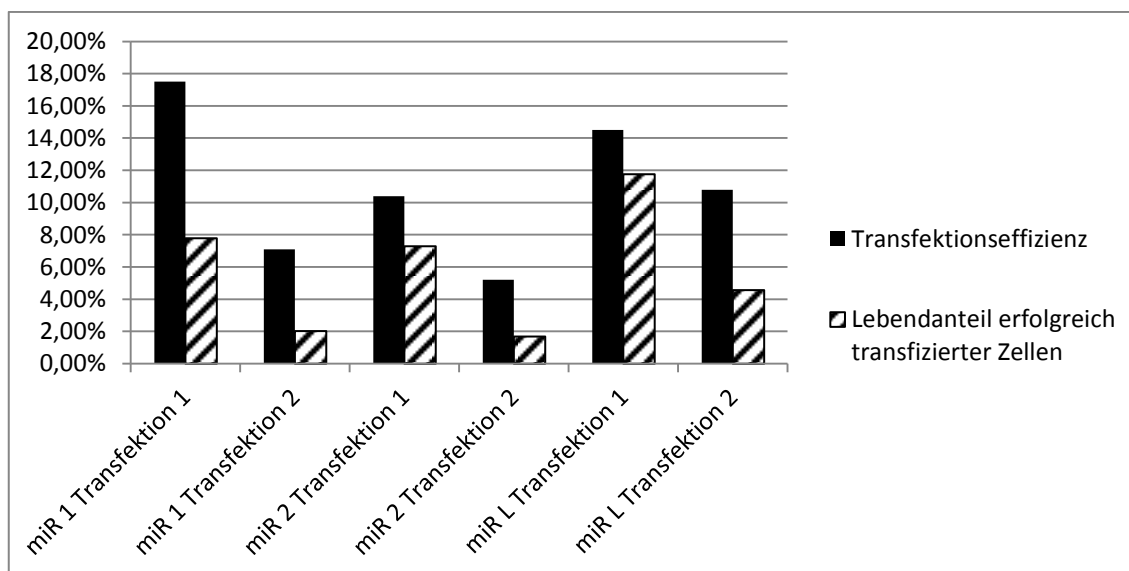


Abbildung 39: Ergebnis der FACS-Analysen der Transfektionen 1 und 2. Als miR 1 und miR 2 wurden die Vektoren bezeichnet, welche zum Knockdown eingesetzt wurden. Die Leervektortransfektion wurde als miR L bezeichnet. In Versuch 1 konnte eine höhere Transfektionseffizienz erreicht werden als in Versuch 2. Weiterhin war der Lebendanteil an transfizierten Zellen in Versuch 1 höher.

Im Transfektionsversuch 1 konnte für alle Vektoren eine höhere Effizienz erreicht werden als beim zweiten Versuch. Weiterhin war der Anteil lebender Zellen bei diesem Versuch höher. Für miR 1 konnte in Versuch 1 die höchste Transfektionseffizienz mit 17,5% erreicht werden. Insgesamt wurde beobachtet, dass in beiden Versuchen der Anteil an lebend transfizierten Zellen beim Leervektor am höchsten war.

5.5.6.3 Real-Time PCR nach Knockdown von CYP4Z1 in L-428

Nachdem die Zellen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428 mit den Vektoren miR 1, miR 2 und dem miR Leervektor transfiziert worden waren, wurde zum Nachweis des Gen-Knockdown von CYP4Z1 eine Real-Time PCR mit dem Gen-Transkript CYP4Z1 und den HERV-Transkripten CYP4Z1(1) und CYP4Z1(2) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 40, 41 und 42 dargestellt.

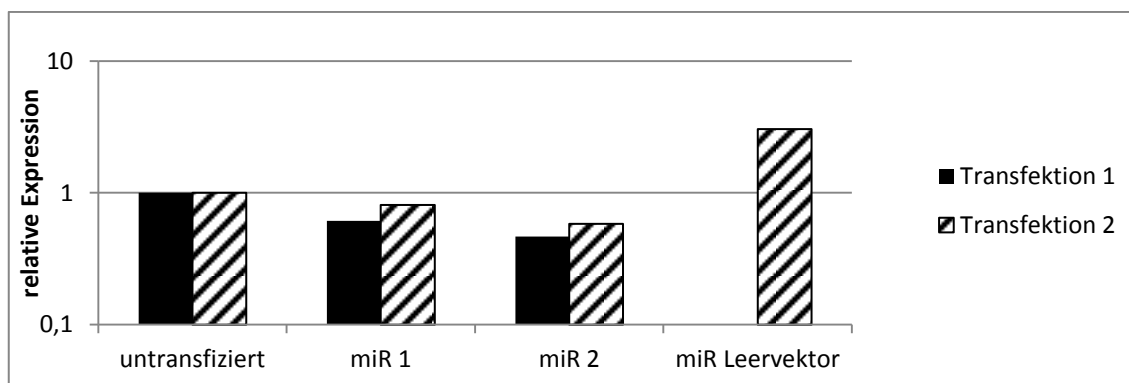


Abbildung 40: Real-Time PCR mit Primern für das Gen CYP4Z1 der L-428 Zellen nach Transfektion mit Vektor miR 1. Durch Vergleich mit den Expressionsdaten untransfizierter Zellen konnte gezeigt werden, dass CYP4Z1 runterreguliert wurde.

Beim Vergleich der Expressionswerte von CYP4Z1 (siehe Abbildung 40) vor und nach Transfektion wird ersichtlich, dass das Gen nach Transfektion von miR 1 und miR 2 eine geringe Runterregulierung zeigte. Bei Transfektion 1 des Leervektors konnte keine Genexpression beobachtet werden, bei Versuch 2 wurde CYP4Z1 nach Leervektortransfektion hochreguliert.

Die Real-Time PCR von HERV CYP4Z1(1) und HERV CYP4Z1(2) vor und nach Transfektion sind in den Abbildungen 41 und 42 dargestellt.

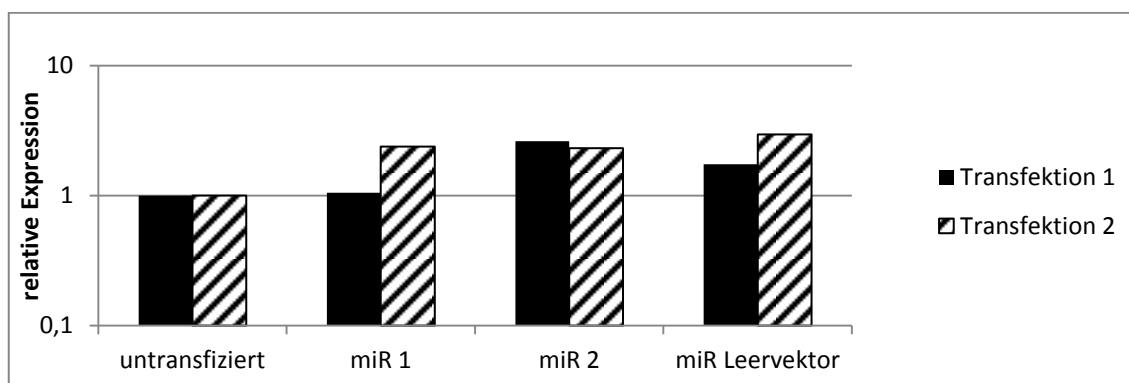


Abbildung 41: Real-Time PCR mit Primern für HERV CYP4Z1(1) der L-428 Zellen nach Transfektion mit Vektor miR 2. Es konnte gezeigt werden, dass HERV CYP4Z1(1) nach Transfektion hochreguliert wurde.

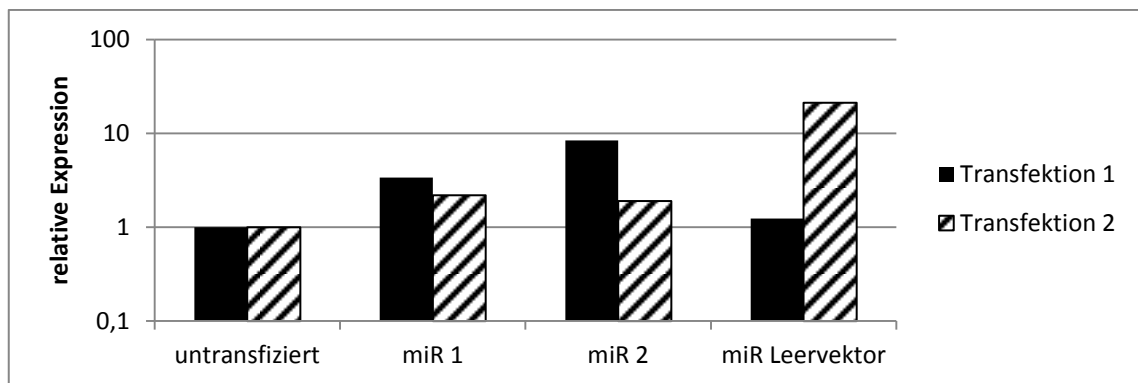


Abbildung 42: Real-Time PCR mit Primern für HERV CYP4Z1(2) der L-428 Zellen nach Transfektion mit dem miR Leervektor. Es konnte gezeigt werden, dass HERV CYP4Z1(2) nach Transfektion hochreguliert wurde.

Beide HERV-Transkripte zeigten eine Hochregulation der Transkripte nach Transfektion von miR 1, miR 2 und miR Leervektor.

Gezeigt werden konnte, dass CYP4Z1 nur in Zellen des Hodgkin-Lymphoms amplifiziert wurden. Die Auswertung der Microarray-Daten dieses Gens ergab, dass alle Probe Sets eine Hochregulation in Hodgkin-Lymphomzellen zeigten. Weiterhin sind einige dieser Probe Sets assoziiert zu endogenen Retroviren. Auch das Pseudogen CYP4Z2P zeigt ein ähnliches Expressionsverhalten wie CYP4Z1. Mittels SMART-PCR konnten drei Transkripte dieses Gens amplifiziert werden. Das Gen CYP4Z1 konnte durch Transfektion von miR-Vektoren erfolgreich runterreguliert werden. Dies führte zu einer verstärkten Apoptose der Zellen und einer Hochregulation der HERV-Transkripte.

6 Diskussion

6.1 Expression von HERV-Transkripten in Hodgkin-Lymphomzellen

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein von Transkripten humaner, endogener Retroviren untersucht, welche eine Assoziation zu differentiell exprimierten Genen in Hodgkin-Lymphomzellen zeigten. Aufgrund vorliegender Ergebnisse aus Analysen von Microarray-Daten wurden Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms und Proben peripherer Blutzellen auf Transkripte der Familie HERV-H untersucht. In allen getesteten Zelllinien, ausgenommen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-540, konnten Transkripte dieser HERV-Familie mittels PCR amplifiziert werden.

Mitglieder der HERV-H Familie weisen oftmals defekte Elemente oder Deletionen auf. Sie beinhalten noch große offene Leserahmen (ORF's), welche auf ein gemeinsames Provirus zurück zu führen sind. Bislang wurden 926 humane endogene Retroviren identifiziert, welche zur Familie der HERV-H Retroviren gehören (Mangeney et al, 2001). Mangeney et al. identifizierten eine Domäne, welche mit einer immunsuppressiven Sequenz verwandt ist.

Solche Sequenzen können möglicherweise als Prädispositionsfaktor für die Entstehung tumoröser Erkrankungen angesehen werden. Immunsuppressive Effekte können im Allgemeinen einen Einfluss auf das Hodgkin-Lymphom haben. Hierzu zählt vor allem der immunsuppressive Effekt des Hodgkin-Lymphoms selbst.

Weiterhin konnte ein Transkript des HERV 17 amplifiziert werden, welche eine Assoziation zum Gen CYP4Z1 zeigte. Für dieses endogene Retrovirus sind in der Literatur bislang noch keine Erkenntnisse zu etwaigen pathogenen Eigenschaften bekannt.

Die bereits gewonnen Erkenntnisse legten Nahe, dass mit den Genen CYP4Z1, BLM, FANCD2, DKC1 und TRIM24 assoziierte HERV-Transkripte in unterschiedlichen Zelllinien differentiell exprimiert werden. Daher wurde spezifischer versucht, HERV-Transkripte in Hodgkin-Lymphomzellen zu amplifizieren. Zu diesem Zweck wurden Primer für die assoziierten HERV-Regionen der genomischen DNA der genannten Gene entworfen. Die Transkripte, welche hierbei amplifiziert werden sollten, resultierten aus den Analyseergebnissen des *HERV-Test* Programmes. Die zu amplifizierenden Bereiche wiesen jeweils eine große Homologie zu Transkripten endogener Retroviren auf. Für alle untersuchten Bereiche konnten Transkripte amplifiziert werden. Die Produkte wurden sequenziert und konnten als Transkripte der jeweiligen genomischen Bereiche identifiziert werden. Die Sequenzen der Gen-assoziierten HERVs befinden sich Anhang dieser Arbeit.

Aufgrund der bislang fehlenden HERV-Annotationen in wissenschaftlichen Datenbanken war es nicht möglich die Transkripte einer HERV-Familie zuzuordnen. Zur Beurteilung der differentiellen Expression der HERV-Transkripte in unterschiedlichen Zelllinien wurden *Real-Time* PCR's durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten HERV-Transkripte in den untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2 und HDLM-2 exprimiert werden. In der PBMC Probe BC330 waren außerdem Transkripte für HERV CYP4Z1(1), HERV FANCD2, HERV BLM, HERV DKC1 sowie HERV TRIM24 nachweisbar. Der Vergleich der Expressionswerte der HERV-Transkripte untereinander zeigte, dass diese nur gering differentiell exprimiert werden. HERV CYP4Z1(2) war in allen verwendeten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, nicht aber in BC330 amplifizierbar.

Somit wurde gezeigt, dass HERVs in unterschiedlichen Zelllinien exprimiert werden. Das HERV CYP4Z1(2) zeigte als einziges untersuchtes Transkript eine Expression nur in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien. Dies lässt den Verdacht zu, dass dieses HERV möglicherweise in Verbindung mit dem Tumorgeschehen steht.

Wie bereits ausgeführt wurde, zeigte das Gen CYP4Z1 in allen durchgeführten Untersuchungen eine stark differentielle Expression in Lymphomzellen im Vergleich zu gesunden, peripheren Blutzellen. Daher wurde mittels PCR das Auftreten von Transkripten in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, Zelllinien des peripheren Blutes (BC330 und BC332) sowie lymphoblastoiden Zelllinien (NM1Ib, A2+2310, EREB2-5 mit und ohne Östrogen) überprüft. Es zeigte sich, dass dieses Transkript in vier von fünf Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und in einer PBMC Probe nur geringfügig exprimiert wird. In allen lymphoblastoiden Zelllinien wurde das Transkript nachgewiesen. Entgegen der Erwartung, dass eine größere Produktmenge in EREB2-5 nachzuweisen wäre, wurden hier weniger Transkripte amplifiziert. Die sogenannten EREB's gehören zu den lymphoblastoiden Zelllinien und sind nur durch Zugabe von Östrogen in der Lage die Proliferation aufrecht zu erhalten (Kempkes et al, 1995). Diese Zellen eignen sich als Modell für proliferierende B-Zellen beziehungsweise B-Zelllymphome, in welchen der Immortalisierungsstatus experimentell an- beziehungsweise abgeschaltet werden kann. Zugleich könnte jedoch auch das zur Anschaltung der EBNA2-Funktion eingesetzte Östrogen an der Genregulation beteiligt sein. Daher sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit überprüft werden, ob Östrogen auf andere Zelllinien einen ähnlichen Effekt hat. Aufgrund dessen wurden auch die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, L-540, KM-H2 und HDLM-2 sowie die LCL A2+2310 über vier Tage mit Östrogen kultiviert. Danach wurde die Expression von HERV- und Gen-Transkripten mit jener bei Kultivierung ohne Östrogen verglichen. Für HERV-Transkripte bei Östrogenkultivierung konnte in den

Zelllinien L-1236, L-540, KM-H2, HDLM-2 sowie A2+2310 und EREB2-5 eine geringere Expression beobachtet werden. Nur in der Zelllinie L-428 waren die HERV-Transkripte hochreguliert. Eine Ausnahme bildete nur das Transkript HERV CYP4Z1(1). Hier zeigte sich in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien eine Hochregulation. Gen-Transkripte wurden nach Östrogenzugabe ebenfalls differentiell exprimiert. Das Gen BLM zeigte unter Östrogen in L-428, L-540 sowie A2+2310- und EREB2-5-Zellen eine Hochregulation, in den anderen untersuchten Zelllinien wurde es herunterreguliert. Die Transkripte FANCD2_1 und FANCD2_2 sowie das Gen CYP4Z1 wurden in allen Zelllinien hochreguliert. Die Transkripte DKC1_1 und DKC1_2 zeigten eine Hochregulation in L-428- und EREB2-5-Zellen, in allen anderen untersuchten Zelllinien zeigte sich eine geringere Expression.

Eine Verallgemeinerung bezüglich der Expression von Gen-Transkripten unter dem Einfluss von Östrogen kann nicht getroffen werden. Vermutlich ist die Regulation der Gene abhängig von deren Funktion und dem Zustand, in welchem sich die Zellen befinden. Ähnlich verhält es sich bei HERV-Transkripten. Möglicherweise werden HERVs verstärkt exprimiert, sobald die Zellen einen Apoptosezustand erreichen. Durch diese Stresssituation wird die Expression vieler Transkripte verstärkt. Da die Zellen unter Östrogen schnell proliferierten ist davon auszugehen, dass sich die Zellen in einem guten Zustand befanden. Es ist daher anzunehmen, dass HERV-Transkripte durch Östrogen herunterreguliert werden. Diese Regulierungseffekte waren in der Zelllinie EREB2-5 am deutlichsten. Dies lässt darauf schließen, dass hierbei die Abhängigkeit der Funktion von EBNA2 eine bedeutende Rolle spielt. In allen anderen Zelllinien könnten die schwächeren unterschiedlichen Effekte der Regulierung auch auf der Bindung des Östrogens an den Östrogenrezeptor beruhen.

6.2 Untersuchung der Expression des Gens CYP4Z1 in Hodgkin-Lymphom-Zellen

Die Auswertung von Microarray-Daten im Vorfeld dieser Arbeit zeigten, dass das Gen CYP4Z1 in Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms gegenüber PBMCs überexprimiert wird. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das HERV Transkript CYP4Z1(2) nur in Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms exprimiert wird. Daher wurde vermutet, dass dieses Gen möglicherweise spezifisch für das Hodgkin-Lymphom sein könnte. Im Verlauf dieser Arbeit wurden unterschiedliche Untersuchungsmethoden für dieses Gen angewandt, welche im Folgenden beschrieben werden.

Zunächst wurde die Expression von CYP4Z1 anhand der vorhandenen Microarray-Daten betrachtet. Auffällig war, dass alle Probe Sets eine Hochregulation gegenüber PBMCs zeigten. Weiterhin waren vier der sechzehn Probe Sets assoziiert zu einem endogenen Retrovirus. Das Probe Set 2335015 befand sich vor Exon 1 im genomischen Bereich der DNA. Daher sollte überprüft werden, wo sich der Transkriptionsstart des Gens CYP4Z1 befindet. Zur Klärung wurde die Methode der SMART-PCR angewandt. Hierfür wurde zunächst eine Erststrangsynthese mit RNA der Zelllinie L-428 durchgeführt, wobei am Poly-A Schwanz der RNA (3'-Ende) der CDSIIA Primer angehängt wird. Die Superscript Reverse Transkriptase verknüpft den Strang mit den Oligo(dT)s. Somit entsteht die eigentliche cDNA an deren 5'-Ende durch die terminale Transferaseaktivität einige C-Reste addiert werden. Hier bindet der BD SMART T7 Primer aufgrund seines GGG-Endes, wodurch die Sequenz ebenfalls übersetzt und die cDNA durch Nukleotide ergänzt wird. Im Anschluss wurde zur Amplifizierung der Gen-Produkte eine PCR mit T7 Extension Primer (vorwärts) und CYP4Z1 rückwärts Primer durchgeführt. Hierbei konnten drei Transkripte mit einer Größe von 1212 bp (SMART_A), 1088 bp (SMART_B), und 134 bp (SMART_C) amplifiziert werden. Mittels Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass es sich um Transkripte des Gens CYP4Z1 handelt. In SMART_A wird ein Bereich von Exon 1 bis Exon 10 exprimiert, wobei überraschenderweise außerdem ein Teil der genomischen Sequenz vor Exon 1 mit amplifiziert wurde. Bei SMART_B wird im Vergleich zu SMART_A das Exon 2 nicht exprimiert. Mit dem Tool *Splice Site Prediction by Neural Network* konnte eine Splice-Stelle vor dem Transkriptionsstart der Sequenzen SMART_A und SMART_B mit einem Score von 0,49, eine weitere in Exon 1 mit einem Score von 0,96 lokalisiert werden. Aufgrund dessen wird in diesen Transkripten nicht das komplette Exon 1 transkribiert. SMART_C ist ein Transkript des Exons 10, bei welchem außerdem ein Teil der genomischen DNA-Sequenz vor diesem Exon mit exprimiert wird. Alle Sequenzen wurden mit der mRNA beziehungsweise der genomischen DNA von CYP4Z1 verglichen.

Die DNA-Sequenzen für SMART_A, SMART_B und SMART_C wurden in die Proteinsequenzen übersetzt. Weiterhin konnte mit dem *Neural Network Promoter Prediction Tool* eine Promotorsequenz in der genomischen DNA-Sequenz vor SMART_A und SMART_B mit einem Score von 0,49 lokalisiert werden. Dabei wurde festgestellt, dass nur SMART_A und SMART_B in ein Protein umgeschrieben werden, da nur hier ein offener Leserahmen entsteht. In Abbildung 43 sind die aus der mRNA abgeleiteten Proteinstrukturen aus der NCBI *Gene*-Datenbank sowie die Strukturen für SMART_A und SMART_B dargestellt.

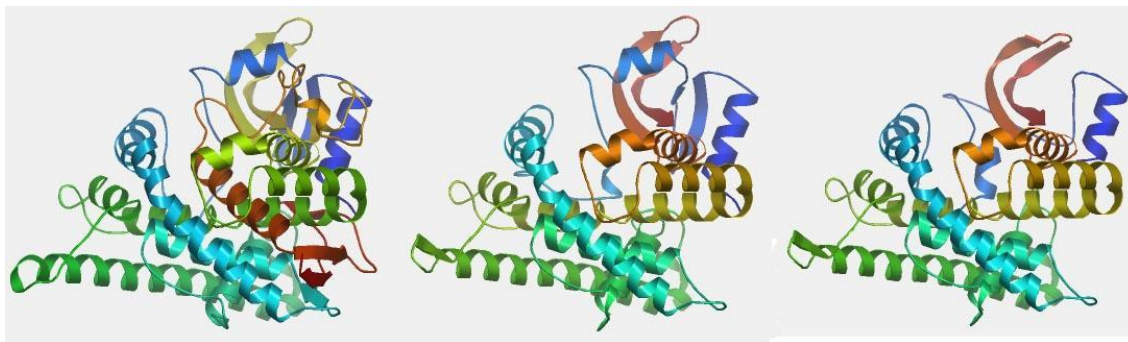


Abbildung 43: 3D-Proteinstruktur aus der Referenz-mRNA (links), dem SMART_A Transkript (Mitte), dem SMART_B Transkript (rechts) für CYP4Z1. Die DNA-Sequenzen wurden in die Proteinsequenz umgeschrieben und mit Hilfe der Tools *SWISS-Model* und *SWISS PubViewer* die jeweilige 3D-Struktur vorhergesagt. Als Template wurde CYP46A1 (Mast et al, 2010) verwendet.

Es zeigt sich, dass die Strukturen eine hohe Homologie zueinander aufweisen. Dies gilt besonders für SMART_A und SMART_B. Die 3D Strukturen sind überwiegend aus α -Helices aufgebaut.

Wie bereits erwähnt, wird in SMART_B das Exon 2 herausgespleißt. Dieser Bereich kodiert in der Proteinsequenz für einen Teil einer konservierten Domäne, welche Sekundärmetabolite der Biosynthese katalysiert sowie für Transport und katabolische Prozesse verantwortlich ist (URL-13). Es ist somit denkbar, dass die Funktion dieser Domäne durch das Fehlen des Exon 2 von CYP4Z1 in SMART_B verloren geht.

Durch eine PCR mit Primern, welche sich in Exon 1 und Exon 3 befanden, konnten ebenfalls zwei Transkripte amplifiziert werden. Somit wurde bewiesen, dass die Ergebnisse der SMART-PCR kein Zufallsergebnis waren und mehrere Transkripte des Gens CYP4Z1 (mit und ohne Exon 2) existieren. Außerdem konnte mit vorwärts Primer für HERV CYP4Z1(2) und rückwärts Primer des Gens CYP4Z1 ein Transkript amplifiziert werden, welches dem SMART_C Produkt entsprach. Aufgrund der vorhandenen Splice-Site und der Promotorsequenz vor den Sequenzen SMART_A und SMART_B kann davon ausgegangen werden, dass sich der Transkriptionsstart an dieser Stelle befindet. Außerdem kann vermutet werden, dass weitere Transkripte dieses Gens existieren, da der vorwärts Primer in Exon 1 in einem Sequenzbereich liegt, welcher in den SMART-Transkripten nicht amplifiziert wurde. Daher wird angenommen, dass mindestens vier Transkripte existieren: jeweils 2 mit und ohne Exon 2 und jeweils 2 mit und ohne den in den SMART-Produkten fehlenden Teil von Exon 1. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Struktur des Exon 1 von der publizierten in der NCBI Datenbank abweicht.

Es wurden die gefundenen HERV-Transkripte für HERV CYP4Z1(1) und HERV CYP4Z1(2) mit der Sequenz der vorhergesagten HERV-Region aus der NCBI *Gene*-

Datenbank verglichen. Für HERV CYP4Z1(1) wurde festgestellt, dass das mittels PCR amplifizierte Produkt vier Mutationen und eine Insertion aufweist. HERV CYP4Z1(2) stimmte komplett mit der vorhergesagten Sequenz überein. Dies gilt auch für die Vergleichssequenz, welche dem PCR Produkt mit vorwärts Primer für HERV CYP4Z1(2) und rückwärts Primer für CYP4Z1 entsprach. Gleiches gilt für SMART_C. Allerdings konnte am 3'-Ende dieses Transkriptes der BD SMART T7 Primer nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um den Transkriptionsstart dieses Produktes handelt. Mit dem Tool *Neural Network Promoter Prediction* konnten im Sequenzbereich vor Exon 10 mehrere Promotersequenzen (allerdings mit niedrigen Scores von 0,13 bis 0,16) vorhergesagt werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass das HERV CYP4Z1(2) hier einen alternativen Promoter darstellt.

Das Pseudogen von CYP4Z1, CYP4Z2P, konnte ebenfalls amplifiziert werden. Dieses Transkript wurde bereits 2004 von Rieger et al. in Verbindung mit Brustkrebs beschrieben. Die *Real-Time* PCR ergab, dass dieses Transkript ebenso wie CYP4Z1 in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-428, L-1236, KM-H2 und HDLM-2, nicht aber in PBMCs exprimiert wird. Pseudogene haben möglicherweise eine regulatorische Funktion in den Zellen. CYP4Z2P weist eine sehr hohe Homologie zu CYP4Z1 auf. Das in dieser Arbeit amplifizierte Transkript unterscheidet sich nur durch einen G/A-Austausch von der CYP4Z1 Sequenz. Dieses Pseudogen ist vermutlich sehr spät in der Evolution entstanden. Die intakte Intron-Exon-Struktur lässt darauf schließen, dass CYP4Z2P aus einer Genduplikation hervorgegangen ist. Oftmals werden Pseudogene nicht exprimiert. Allerdings wäre es möglich, dass CYP4Z2P durch die Aktivität endogener Retroviren exprimiert wird.

Alle Ergebnisse untermauerten den Verdacht, dass CYP4Z1 ein wichtiges Gen in Tumorzellen und möglicherweise spezifisch für das Hodgkin-Lymphom ist. Daher wurden in Tabelle 15 (Kapitel 5.5.5) korrelierende Gene zu CYP4Z1 ermittelt. Ziel war es Gene zu erkennen, welche ein ähnliches Expressionsverhalten wie CYP4Z1 zeigen und somit möglicherweise ein Interaktionsverhalten zeigen beziehungsweise in Zusammenhang stehen. Es wurde jeweils der Korrelationskoeffizient berechnet und die 10 Gene mit dem höchsten Koeffizienten dargestellt. In den Datenbanken des NCBI wurde anschließend nach bereits bekannten Funktionen dieser Gene gesucht, welche im Zusammenhang mit (tumorösen) Erkrankungen, vorwiegend des lymphatischen Systems, stehen.

SH2D1B reguliert die Signaltransduktion durch Rezeptoren, welche in antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden (Morra et al, 2001).

CD58 ist in Prozesse involviert, welche der Optimierung der Immunantwort dienen. Eine Hochregulation könnte daher in Verbindung mit einem krankhaften Prozess innerhalb des

Immunsystems oder einer Erkrankung gebracht werden, durch welche die Immunantwort aktiviert wird (URL-9).

CYP19A1 codiert für die Östrogen-Synthetase, welche die Umwandlung von Androgenen zu Östrogen katalysiert (URL-10). Mutationen dieses Gens führen zu gesteigerter oder verminderter Aktivität der Östrogen-Synthetase (URL-11).

E2F und MYC sind entscheidende Regulatoren der Zell-Proliferation und tragen zur Entstehung von Tumorerkrankungen des Menschen bei. Die Expression des Target-Gens von E2F, ATAD2, wird vom pRB-E2F Pathway reguliert, wodurch der Übergang zur S-Phase des Zellzyklus limitiert wird. ATAD2 befindet sich auf Chromosome 8 in einem Bereich, welcher in Krebszellen amplifiziert wird. Daraus resultiert eine Hochregulation dieses Gens in menschlichen Tumorzellen. Durch ATAD2 werden die Pathways von E2F und MYC verbunden. Außerdem trägt dieses Gen zur Entstehung aggressiver Tumoren, durch eine erhöhte MYC Transkription, bei (Ciró et al, 2009). EPAG ist assoziiert zur Proliferation von lymphatischem Gewebe. Weiterhin zeigt sich eine Assoziation zur mitogenen Aktivierung von B- und T-Zellen in peripherem Blut. Das Gen EPAG ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Dizikes et al, 1995). Isoliert wurde dieses Gen erstmals aus Zellen der Zelllinie L-428 und wird in PBMCs ebenso exprimiert (Bennett et al, 1994).

Für die zur Expression von CYP4Z1 korrelierenden Gene ETNK1, IFIH1, MCM10, SAMS1 und IRAK1BP1 konnten keine Assoziation zu Erkrankungen oder Fehlregulationen des lymphatischen Systems festgestellt werden.

Im letzten Schritt sollte durch CYP4Z1-Knockdown geprüft werden, ob dieses Gen in Hodgkin-Lymphomzellen eine wichtige Rolle spielt. Es wurden zwei Transfektionen durchgeführt. Dabei wurden zunächst zwei einzelsträngige miR-RNAi Oligonukleotide, welche anhand der mRNA des Gens CYP4Z1 mit dem BLOCK-iTTM RNAi Designer entworfen wurden, miteinander hybridisiert. Anschließend erfolgte die Ligation in den pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR-Vektor. Dieser wurde in *E. coli* transformiert und nach 17 Stunden Inkubation isoliert. Im Anschluss erfolgte die Transfektion in die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428.

Die haarnadelförmige *precursor miRNA* wird im Zytosol der Zellen durch Dicer in 21-25 bp große Fragmente gespalten. Der Leitstrang bindet an den *RNA-induced silencing complex*. Nach Spaltung des Doppelstrangs bindet der Leitstrang komplementär an die mRNA, wodurch diese durch eine Endonuklease abgebaut werden kann. Durch diesen Vorgang kann die Translation der mRNA verhindert und das Gen abgeschaltet werden (URL-12).

Um den Transfektionserfolg beurteilen zu können wurden die 6-Well Platten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Bei allen Ansätzen konnten grüne Zellen, also erfolgreich transfizierte Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, nachgewiesen werden. Desweiteren wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, Zellen auf funktionelle, quantitative und qualitative Unterschiede zu untersuchen. Die Zellprobe wird dabei mit Licht bestrahlt. Anhand der Streuungs- und Fluoreszenzsignale kann anschließend auf die Merkmale der Zellen geschlossen werden. Es konnten Transfektionseffizienzen zwischen 1,5 % und 17 % erreicht werden. Dies entspricht der gängigen Laborpraxis. Ein kompletter Knockout ist daher nicht möglich, da hierbei alle Zellen erfolgreich transfiziert werden müssten. Der Anteil lebender, erfolgreich transfizierter Zellen war im ersten Transfektionsversuch höher als bei Transfektion 2. Außerdem fiel auf, dass Zellen, welche mit miR 1 oder miR 2 transfiziert wurden einen deutlich geringeren Anteil an lebenden Zellen aufwiesen als bei Transfektion mit Leervektor. Dies deutet darauf hin, dass nach Ausschalten des Gens CYP4Z1 der Zelltod eintritt. Mittels *Real-Time* PCR konnte gezeigt werden, dass CYP4Z1 bei Transfektion mit miR 1 oder miR2 herunterreguliert wurde. Nach Leervektortransfektion konnte dieses Gen im ersten Versuch nicht nachgewiesen werden. Dies dürfte auf einen Fehler der PCR zurückzuführen sein. In Versuch 2 zeigte sich eine Überexpression. Diese war im Vergleich zu den Expressionswerten der untransfizierten Zellen gering. Die HERV-Transkripte von CYP4Z1 (HERV CYP4Z1(1) und HERV CYP4Z1(2)) wurden in transfizierten Zellen hochreguliert. Dies bestätigt den Verdacht, dass HERV-Transkripte beim Eintreten der Apoptose verstärkt exprimiert werden.

Die Transfektionsversuche können als erfolgreich angesehen werden. Zwar konnten keine hohen Transfektionseffizienzen erreicht werden, allerdings konnte gezeigt werden, dass CYP4Z1 in Zellen eine wichtige Rolle spielt, da nach Knockdown des Gens ein gesteigertes Apoptoseverhalten der Zellen zu beobachten war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CYP4Z1 in Zellen des Hodgkin-Lymphoms eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Möglicherweise ist dieses Gen sogar spezifisch für Zellen des Hodgkin-Lymphoms und könnte somit zukünftig als Tumormarker dienen.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HERV-Transkripte in Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms, lymphoblastoiden Zelllinien und PBMCs exprimiert werden. Auch konnten regulatorische Effekte von Östrogen beobachtet werden. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob diese Transkripte auch in anderen Geweben nachgewiesen werden können. Dabei sollten nicht nur unterschiedliche Tumorgewebe sondern auch gesundes, menschliches Gewebe in die Betrachtung einbezogen werden. Dies könnte Erkenntnisse über die Spezifität dieser HERV-Transkripte liefern und es könnten weitere Ansatzpunkte für die Ursachenforschung des Hodgkin-Lymphoms gewonnen werden.

Mittels Knockdown von CYP4Z1 konnte gezeigt werden, dass dieses Gen vermutlich essentiell für die Tumorzellen sein könnte. Weiterhin sollte die Transfektion in allen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, anderen Tumorgeweben und PBMCs durchgeführt werden. Dabei könnten weitere Erkenntnisse über die Spezifität von CYP4Z1 in Hodgkin-Lymphomzellen gewonnen werden. Wenn CYP4Z1 eine solche Spezifität für Hodgkin-Lymphomzellen zeigen würde, könnte die gezielte Abschaltung dieses Gens Grundlage für neue Therapieansätze sein. Auch sollten Untersuchungen des Expressionsverhaltens der zu CYP4Z1 korrelierenden Gene durchgeführt werden. Hieraus könnten sich weitere Ansätze für die Ursachenforschung ergeben.

In der vorliegenden Arbeit konnten durch Auswertung von Exonarray-Daten mittels des *HERV Test* Programmes neue HERV-assoziierte Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden. Das Verfahren sollte daher auch an weiteren differentiell exprimierten Genen erprobt werden. Zugleich wäre es interessant, mit den modernen *Next-Generation-Sequencing*-Techniken zu prüfen, ob auch hiermit ähnliche Resultate ohne die komplizierte und störanfällige SMART/RACE-Technik erhalten werden können. Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch mit einem hohen Kostenaufwand verbunden.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane endogene Retroviren in Zellen des Hodgkin-Lymphoms, lymphoblastoiden Zellen und peripheren Blutzellen exprimiert werden. Neben Transkripten für HERV-H und HERV17 konnten für die vorhergesagten HERV-Regionen der, in einer vorangegangenen Arbeit untersuchten, Gen-Transkripte amplifiziert werden. Dies wurde anhand von Sequenzierungen der untersuchten Transkripte bestätigt. Das Transkript HERV CYP4Z1(2) wurde sogar nur in Hodgkin-Lymphomzellen und den verwandten lymphoblastoiden Zellen nachgewiesen. Eine generelle Hochregulation in Lymphomzellen dieser HERV-Transkripte gegenüber PBMCs, wie es in einer vorangegangenen Arbeit für die assoziierten Gene gezeigt werden konnte, wurde nicht nachgewiesen. Weiterhin wurde der Einfluss von Zellproliferation auf das Expressionsverhalten von HERV und Gen-Transkripten betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Gen- und HERV-Regulation vermutlich abhängig vom Zellzustand ist. Unter Östrogen-regulierter Aktivierung der EBNA2-Funktion in konditional Epstein-Barr-Virus-immortalisierten Zellen konnte eine gesteigerte Proliferation der Zellen beobachtet werden, was auf einen guten Zustand der Zellen schließen lässt. Dabei führte Östrogen zu einer Runterregulation von HERV-Transkripten. Für Gen-Transkripte konnte der Einfluss von Östrogen nicht verallgemeinert werden, da die Gen-Transkripte nach Östrogenzugabe unterschiedlich exprimiert, also entweder hoch- oder runterreguliert wurden.

Untersuchungen des Gens CYP4Z1 konnten bestätigen, dass dieses Gen in Hodgkin-Lymphomzellen im Vergleich zu PBMCs ein differentielles Expressionsverhalten zeigt. Es konnten zwei neue Transkripte des Gens identifiziert werden, deren Transkriptionsstart sich vor Exon 1 befindet und die differentiell gespleißt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HERVs als alternative Promotoren wirken können. Außerdem wurde ein Knockdown des Gens CYP4Z1 durchgeführt, wonach die Zellen ein gesteigertes Apoptoseverhalten zeigten. Die gesteigerte HERV Expression dieser Zellen bestätigt ebenfalls den Verdacht, dass Zellen vor Eintritt der Apoptose verstärkt HERV-Transkripte exprimieren.

Die bestätigt, dass HERVs eine Funktion innerhalb der Zellen haben. Für Gene, welche eine korrelierende Expression zur Genexpression von CYP4Z1 zeigten, konnten ebenfalls Assoziationen zu regulatorischen Funktionen, speziell des Immunsystems, ermittelt werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Hochregulation dieser Gene in Verbindung mit der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms stehen könnte.

9 Summary

Human endogenous retroviruses are expressed in cells of Hodgkin lymphoma, lymphoblastoid cells und cells of peripheral blood. Next to transcripts of HERV-H and HERV17, endogenous retroviruses of predicted regions from up-regulated genes (analysis of a further study) could be amplified. This could be validated by sequencing. The transcript HERV CYP4Z1(2) was experimentally verified in cells of Hodgkin lymphoma and lymphoblastoid cells. A generally up-regulation of these transcripts in Hodgkin lymphoma cells as compared to peripheral blood cells could not be shown. The influence of proliferation on the expression of HERV and gene transcripts was observed. The regulation of genes and HERVs is probably dependent on the conditions of the cells. Because of the increased proliferation it is to assume that the cells were well-conditioned and HERV transcripts are regulated down. An influence of proliferation on the regulation of gene transcripts couldn't be generalized because the gene transcript became differentially regulated after addition of estrogen.

Analyses of CYP4Z1 have been confirmed that this gene is differentially expressed in cells of Hodgkin lymphoma and peripheral blood cells. Two new transcripts could be identified whose start of transcription is located in front of exon 1. Both transcripts become differentially spliced. Furthermore it could be shown that HERVs can act as alternative promoters. The knockdown of CYP4Z1 induced apoptosis of the cells and the up-regulation of HERV transcripts. This demonstrates the correlation between apoptosis and high regulation of HERVs and the important function of such transcripts within the cells. For genes that showed a correlating expression to CYP4Z1 it could be determined an association to regulatory functions, especially on the immune system. Therefore, it can be assumed that the up-regulation of that genes is associated with the pathogenesis of Hodgkin lymphoma, too.

Literaturverzeichnis

- Bennett, J.S.; Tredway, T.L.; Dizikes, G.J.; Nawrocki, J.F. (1994): Properties of a novel gene isolated from a Hodgkin's disease cell line that is expressed early during lymphoid cell activation. *J Immunol.* 152:2229-40.
- Berger, D. P.; Engelhardt, R.; Mertelsmann, R. (2010): *Das Rote Buch. Hämatologie und internistische Onkologie.* 4. Auflage: Landsberg, ecomed Medizin Verlag.
- Buselmaier, W.; Tariverdian, G. (2007): *Humangenetik.* 4. Auflage: Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- Ciró, M.; Prosperini, E.; Quarto, M.; Grazini, U.; Walfridsson, J.; McBlane, F.; Nucifero, P.; Pacchiana, G.; Capra, M.; Christensen, J.; Helin, K. (2009): ATAD2 is a novel cofactor for MYC, overexpressed and amplified in aggressive tumors. *Cancer Res.* 69; 8491-8.
- Dizikes, G.J.; Bennett, J.S.; Metz, R.J.; Nawrocki, J.F. (1995): The lymphoid proliferation-associated gene EPAG maps to human chromosome region Xq21-->q22. *Cytogenet Cell Genet.* 70:126-8.
- Doerr, H. W.; Gerlich, W. H. (2002): *Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen.* 2., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage: Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Gutjahr, P. (20054): *Krebs bei Kindern und Jugendlichen. Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie.* 5. Auflage: Köln, Deutscher Ärzte Verlag.
- Hirsch-Kauffmann, M.; Schweiger, M.; Schweiger, M.-R. (2009): *Biologie und molekulare Medizin.* 7 Auflage: Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Kempkes, B.; Spitkovsky, D.; Jansen-Dürr, P.; Ellwart, J. W.; Kremmer, E.; Delecluse H.-J.; Rottenberger, C.; Bornkamm, G. W.; Hammerschmidt, W. (1995): B-cell proliferation and induction of early G₁-regulation proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *EMBO J* 14: 88-96.
- Krams, M.; Frahm, S. O.; Kellner, U.; Mawrin, C. (2009): *Kurzlehrbuch Pathologie.* 1. Auflage: Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Kruse, K. (2011): Analysis of gene expression in correlation to endogenous retroviruses. Bachelorarbeit im Fachbereich Bioinformatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mangeney, M.; de Parseval, N.; Thomas, G.; Heidmann, T. (2001): The full length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol.* 82:2515-18.
- Mast, N.; Charvet, C.; Pikuleva, I.A.; Stout, C.D. (2010): Structural basis of drug binding to CYP46A1, an enzyme that controls cholesterol turnover in the brain. *J Biol Chem.* 285:31783-95.

- Morra, M.; Howie, D.; Grande, M.S.; Sayos, J.; Wang, N.; Wu, C.; Engel, P.; Terhorst, C. (2001): X-linked lymphoproliferative disease: a progressive immunodeficiency. *Annu Rev Immunol.* 19:657-82.
- Müller J. (2011): Etablierung und Charakterisierung einer cDNA-Bank aus Hodgkin-Lymphom-Zellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Park, B.K.; Zhang, H.; Zeng, Q.; Dai, J.; Keller, E. T.; Giordano, T.; Gu, K.; Shah, V.; Pei, L.; Zarbo, R. J.; McCauley, L.; Shi, S.; Chen, S.; Wang, C.-Y. (2007): NF-kappa-B in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat. Med.* 13: 62-69.
- Pikarsky, E.; Porat, R. M.; Stein, I.; Abramovitch, R.; Amit, S.; Kasem, S.; Gutkovich-Pyest, E.; Urieli-Shoval, S.; Galun, E.; Ben-Neriah, Y. (2004): NF-kappa-B functions as a tumour promotor in inflammation-associated cancer. *Nature*- 431: 461-466.
- Rieger, M.A.; Ebner, R.; Bell, D.R.; Kiessling, A.; Rohayem, J.; Schmitz, M.; Temme, A.; Rieber, E.P.; Weigle, B. (2004): Identification of a novel mammary-restricted cytochrome P450, CYP4Z1, with overexpression in breast carcinoma. *Cancer Res.* 64:2357-64.
- Ruprecht, K.; Mayer, J.; Sauter, M.; Roemer, K.; Mueller-Lantzsch, N. (2008): Endogenous retroviruses and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 65:3366-82.
- Schmoll, H. J.; Höffken, K.; Possinger, K. (2006): Kompendium Internistische Onkologie. Epidemiologie, Tumorbilogie, Zytostatika, Prinzipien der Tumorthherapie, Supportive Maßnahmen. 4. Auflage: Heidelberg, Springer Medizin Verlag.
- Shehadeh, L.A.; Yu, K.; Wang L.; Guevara, A. (2010): SRRM2, a potential blood biomarker revealing high alternative splicing in Parkinson's disease. *PLoS One* 2010. 5:e9104.
- Siemer, D. (2008): Die Rolle des EBV Virus in der Lymphompathogenese. Dissertation im Fachbereich Biologie und Geografie der Universität Duisburg-Essen.
- URL-1 (26/04/2012): Halbsguth, T.: Kompetenznetz maligne Lymphome: Hodgkin Lymphome. Häufigkeit und Ursache. URL: www.lymphome.de/InfoLymphome/HodgkinLymphome/HaeufigkeitenUndUrsache.jsp
- URL-2 (27/05/2012): Kieback, P.: Tumorzytogenetik. URL: <http://www.genetik-dresden.de/seite/tumorzytogenetik>
- URL-3 (13/04/2012): Kniffin, C. L.: Fanconi anemia, complementation group A, FANCA. URL: omim.org/entry/227650
- URL-4 (13/04/2012): O'Neill, M. J. F.: Bloom syndrome; BLM. URL: omim.org/entry/210900
- URL-5 (31.07.2012): Catalogue of human and animal cell lines. URL: www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animals-cell-lines.html
- URL-6 (01.08.2012): CYP4Z1 cytochrome P450, family 4, subfamily Z, polypeptide 1 [Homo sapiens]. URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/199974

URL-7 (01.08.2012) pfam00067: p450 URL:

www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=200971

URL-8 (01.08.2012): Cytochrome p450. URL:

www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=82&evtc=Suggest&evta=MoleculeoftheMonth&vtf=OtherOptions.

URL-9 (20.08.2012): CD58 MOLECULE; CD58. URL:

<http://omim.org/entry/153420?search=CD58&highlight=cd58>.

URL-10 (20.08.2012): CYTOCHROME P450, FAMILY 19, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1; CYP19A1. URL: omim.org/entry/107910.

URL-11 (20.08.2012): CYP19A1 cytochrome P450, family19, subfamily A, polypeptide 1 [Homo sapiens]. URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1588.

URL-12 (22.08.2012): BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits. URL:

<http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/rnai/Vector-based-RNAi/Pol-II-miR-RNAi-Vectors.html>.

URL-13 (25.08.2012): COG2124: CypX. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=32307>.

URL-14 (26.08.12): SH2D1B SH2 domain containing 1B [*Homo sapiens*] URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/117157>.

URL-15 (27.08.12): BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits. URL: <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/rnai/Vector-based-RNAi/Pol-II-miR-RNAi-Vectors.html>.

Wagner, H.; Fischereeder, M. (2011): Innere Medizin für Zahnmediziner. 2. Auflage: Stuttgart, Thieme Verlag.

Winkler, C.; Steingrube, D. S.; Altermann, W.; Schlaf, G.; Max, D.; Kewitz, S.; Emmer, A.; Kornhuber, M.; Banning-Eichenseer, U.; Staeger, M. S. (2012): Hodgkin's lymphoma RNA-transfected dendritic cells induce cancer/testis antigen-specific immune responses. *Cancer Immunol Immunother* DOI 10.1007/s00262-012-1239-z

Yamamoto, Y.; Verma, U. N.; Prajapati, S.; Kwak, Y.T; Gaynor, R. B. (2003): Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nat.* 423: 655-659.

In dieser Arbeit wurde folgende Software / Datenbanken verwendet:

BLAST (15/03/2012)

Standard Nucleotide Blast. URL:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn

Block-iTTM RNAi Designer von Invitrogen

(<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=mirna&pid=-8773562548917456305>)

Expression Console von Affymetrix

(http://www.affymetrix.com/browse/level_seven_software_products_only.jsp?productId=131414&categoryId=35623#1_1)

GEO DataSet Datenbank am NCBI

GEO DataSets. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>

Gene Datenbank am NCBI

GEO DataSets. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

GeneDoc

A Full Featured Multiple Sequence Alignment Editor, Analyser and Shading Utility for Windows. URL: <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>

HERV Test-Programm

Kruse, K. (2011): konstantin.kruse@student.uni-halle.de

MAFilter (version: 1.0.0.0)

Steingrube, DS: URL: <http://www.steingrube-home.de/>

Net Affx Query | Affymetrix

Net Affx Query. URL: https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/xmlquery_ex.affx?netaffx=wtgene_transcript&_requestid=336602

Neural Network Promoter Prediction

Berkeley Drosophila Genome Project. URL: www.fruitfly.org/seq_tools/promotor.html

Retrosearch Datenbank

Villesen, Palle: Welcome to retrosearch, an online database of Human Endogenous Retroviruses and their ORFs. URL: <http://www.daimi.au.dk/~biopv/herv/>

Splice Site Prediction by Neural Network

Berkeley Drosophila Genome Project. URL: www.fruitfly.org/seq_tools/splice.htm

SWISS Model

SWISS-Model. URL: swissmodel.expasy.org

Anhang

Sequenzen

HERV-H-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

CGTCTCTGCTGTCCTTCGTCTCCCCCAAGCCAAGAGTCCTTTGAATCCTTCTTTTCT
ACAGACCGATCTGACCTCTCCCCTCCTCCCCAGGCTGCTTCTCGCTAGGCCGAGCC
AGGTCCCAACTCTTCCTCAGCCACTGCTCCCCCACCCTATAATCCTTTTATCACTTCC
TCTCCTCACACCCGGTCTGCTTTACAGTTTTCGTTCTGCGACTAGCTCTCCCCCACCT
GCCCAACAATTTCTCTTAGAGAAAGTGGCTGGAGCTGAAGGCATAGTCTGGGTACAT
GTGCCTTTTTCTGTATCAGACTTTTCCCAAATCAGCCAGTGTGTTGGGCTCTTTCTCAT
CAGACCCCACTAAATATATACAGGAATTCCGATATCTAACTCTGTCCTGCAAGTTAAC
CTGCAGTGACTTAAATGTCATCCTGACTTCCACCCTCTCCCCAGATGAACGGGAAAG
AGTTTTTTCTCTAGCCCAGTCTCACGCTGACAACCGCCGGCTTCATGAGCCAGGCCT
CCAGGAAGGCATCAGAGCAGTTCCTCCGAGAGGACCCCCAAAGGAAGTATCAGGCAG
ATTCCCCAGGTATAGCTAGGCGAGATTACATGATTTCTGCCTAGTTGAAGGGCTTA
AAAAGGCAGCACACAAAGCTTTTAATTATGACAAAATTAAAACTACCCGAGGTAAAG
ACGAAAACCCAGCCCAGGTCATGGCCCGCTTAGCAGCAACCCTTAGACGCTTTACC
GCCCTAGACCCAGAGGGGCCGGAAGGCCGCCTTATTCTCAATATGCATTTTATTACC
CAGTCCGCTCCCGACATTAGAAAAAGCTCCAAAAATGAGCTTCCAGTCCTCAAACCC
CACAACAGGACCTAATTAACCGCGCCTTCAAGGTGTACAATAATAAGAGTTGCAATT
ACTTGCCTCTGCTGTGTGAGAAACCCAGCCATATCTCCAGCACACAAAACTTCAA
AACGCCTAAGCCACAGCAGTCAGGCATTTCTTTTCACTTCTCCTCCCCAGGATCTTG
CTTCAAGTGCTGGAAATCTGGCCACTAGGCCAAGGGATGCCACAGACTGGGACTC
TCTAGCCGTGTCCATCTGTGTGGACCCCACTGAACTGAACTGCTACCTGCAGCTCT
GACTGACTCTCAGATCTTTCGTTCGATGCTGAAACATCTACTGGACAGCGCACTTA

CYP4Z1-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

CGCTATGGAAGCACCGCCAGATTGTGAAACCTGGCTTCAACATCAGCATTCTGAAAA
TATTCATCACCATGATGTCTGAGAGTGTTCCGATGATGCTGAACAAATGGGAGGAAC
ACATTGCCCAAACTCACGTCTGGAGCTCTTTCAACATGTCTCCCTGATGACCCTGG
ACAGCATCATGAAGTGTGCCTTCAGCCACCAGGGCAGCATCCAGTTGGACAGTACC
CTGGACTCATACCTGAAAGCAGTGTTCAACCTTAGCAAAATCTCCAACCAGCGCATG
AACAAATTTTCTACATCACAACGACCTGGTTTTCAAATTCAGCTCTCAAGGCCAAATCTT
TTCTAAATTTAACCAAGAACTTCATCAGTTCACAGAGAAAGTAATCCAGGACCGGAAG
GAGTCTCTTAAGGATAAGCTAAAACAAGATACTACTCAGAAAAGGCGCTGGGATTTTC
TGGACATACTTTTGAGTGCCAAAAGCGAAAACACCAAAGATTTCTCTGAAGCAGATCT
CCAGGCTGAAGTGAAAACGTTTCATGTTTGCAGGACATGACACCACATCCAGTGCTAT
CTCCTGGATCCTTTACTGCTTGGCAAAGTACCCTGAGCATCAGCAGAGATGCCGAGA
TGAAATCAGGGAACTCCTAGGGGATGGGTCTTCTATTACCTGGGAACACCTGAGCCA
GATGCCTTACACCACGATGTGCATCAAGGAATGCCTCCGCCTCTACGCACCGGTAGT

AAACATATCCCGGTTACTCGACAAACCCATCACCTTTCCAGATGGACGCTCCTTACCT
GCAGGAATAACTGTGTTTATCAATATTTGGGCTCTTCACCACAACCCCCTA

HERV17 vorwärts Primer

AGCTTGTAAGAAAGCTGAAACTGGATCCCTTCCTTACACCCTAATACAAAAATTAATTC
AAGATGGATTAAAGACTTACATTGTTAGACCTAAAACCATAAAAAATCCTAGAAGAAAA
CCTAGGCAATACCATTACAGGACATAGGCATGGGCAAGGACTTCATGTCTAAACACC
AAAAGCAATGGCAACAAAAGCCAAAATTGACAAATGGGATCTAATTAAGTAAAGAGC
TTCTGCACAGCAAAAGAACTACCATCAGAGTGAACAGGCAACCTACAGAATGGGAG
AAAATTTTTGCAATCTACTCATCTGACAAAGGGCTAATATCCAGAATCTACAAAGAACT
TAAACAAATTTACAAGAAAAAATCAAACAACCCCATCAAAAAGTGAACAAAGGACACT
TCTCAAAAGAAGACATTTATGCAGCCAAAAGACACATGAAAAAATGCTCATCATCACT
GGCCATCAGAGAAATGCAAATCAAAACCACAATGAGATACCATCTCACACCAGTTAG
AATGGCGATCATTAAAAAGTCAGGAAACAACAGGTGCTGACGGGGGATAGCTGAGT

Assoziierte HERVs zu CYP4Z1

HERV CYP4Z1(1)-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des
vorwärts Primers)

GACTTCAAACCTATACTACAAGGCTACAGTAACCAAACAGCATGGTACTGGTACCAA
ACAGAGATATAGATCAATGGAACAGAACAGAGCCCTCAGAAATAATGCCGCATATCT
ACAACCTATCTGATCTTTGACAAACCTGACAAAAACAAGAAATGGGGAAAGGATTCCCT
ATTTAATAAATGGTGCTGGGAAAACCTGGCTAGCCATATGCAGAAAGCTGAAACTGGA
TCCCTTCCTTACACCTTATACAAAAATTAATTCAAGATGGATTAAAGACTTAAATGTTA
GACCTAAAACCATAAAAACCCTAGAAGAAAACCTAGGCAATACCATTACAGGACATAG
GCATGGGCAAGGACTTCATGTCTAAACACCAAAGCAATGGC

HERV CYP4Z1(2)-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des
vorwärts Primers)

CCAAACGCCGCATGTTCTCACTCATAGGTGGGAATTGAGCAGTGAGAACACATTGAC
ACAGGAAGGGGAACATCACACACCAGAGCCTGTTGTGGGGTGGAGGGAGGGGGGA
TGGATAGCATTAGGAGATATACCTAATGTTAAATGACGAGTTAATGGGTGCAGCACA
CCAACATGGCACATGTATACATATGTAACAAACCTTCATGTTGTGCATATGTACCCTA

Assoziiertes HERV zu FANCD2 - HERV FANCD2)-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428
(Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

TCTGATGAGTGGTGCGATCTCAGCTCACTGCAACCTCCGCCTCCTGGGTTCAGCCAT
TCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCACCTGCCACCATGCCCCG
GCTAATTTTTTTGGTATTTAAGTAGAGACGGGGTTTCACCTGTTGGCCAGGATGGTCT
CGATCTCCTGACCCCTTGTGACCGCCCTCCTCGGCCTCCCAGAGTGCTGGGATTAC
AGGGTCACCCCCCCC

Assoziiertes HERV zu BLM - HERV BLM-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

AGTGATGAGTGGCGCGATCTTGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCTGGGTTCACGCC
ATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACCACGCC
CGGCTAATTTTTTGTATTTTTAAAAAAGAGAGGGTTTCACCTTGTTAGCCAGGATGGT
CTCGATCTCCTGCACTCATGATCCCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTAC
ATGCATGGG

Assoziiertes HERV zu DKC1 - HERV DKC1-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

CGGGCGTGGGAGGAGTGGTGATGACTCTTAAGGAGCATGCTGCCTTCAAGCATCTG
TTTAACAAAGCACATCTTGACCGCCCTTAATCCATTTAACCTGAGTGGACACAGCA
CATGTTTCAGAGAGCACAGGGTTGGGGGTAAGGTCACAGATCAACAGGATCCCAAG
GCAGAAGAATTTTTCTTAGTGCAGAACAAAATGAAAAGTCTCCCATGGTTTCTTTTTT
CCCCCAACCCCGG

Assoziiertes HERV zu TRIM24 - HERV TRIM24-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

CGCTCCTGCTAACGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGT
GTGGTGGCAGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAGTGG
CGTGAACCTGGGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATCATGCCACTGCACTCCAG
CCTGGGCAAAAAAAAAAACCTCCCTTA

SMART-Sequenzierungen

Transkript 1 CYP4Z1 – SMART A-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

CAAAGCTTGCATATGGGTGTGAGCTGTCATGCACATGGCTCCTATCTGAAAATCTTGT
TCTTCTAGAATCCAGGTAATCAGGTTGTACCAGAGGAGGAGATGGATGATCAGAGCC
CTGCACCTGTTTCCTGCACCCCCTGCCACTGGTTCTATGGCCACAAGGAGTTTTAC
CCAGTAAAGGAGTTTGAGGTGTATCATAAGCTGATGGAAAAATACCCATGTGCTGTT
CCCTTGTGGGTGGACCCTTTACGATGTTCTTCAGTGTCCATGACCCAGACTATGCC
AAGATTCTCCTGAAAAGACAAGATCCCAAAAGTGCTGTTAGCCACAAAATCCTTGAAT
CCTGGGTGGTTCGAGGACTTGTGACCCTGGATGGTTCTAAATGGAAAAAGCACCGC
CAGATTGTGAAACCTGGCTTCAACATCAGCATTCTGAAAATATTCATCACCATGATGT
CTGAGAGTGTTCCGATGATGCTGAACAAATGGGAGGAACACATTGCCCAAACTCAC
GTCTGGAGCTCTTCAACATGTCTCCCTGATGACCCTGGACAGCATCATGAAGTGTG
CCTTCAGCCACCAGGGCAGCATCCAGTTGGACAGTACCCTGGACTCATACCTGAAA
GCAGTGTTCAACCTTAGCAAAATCTCCAACCAGCGCATGAACAATTTTCTACATCACA
ACGACCTGGTTTTCAAATTCAGCTCTCAAGGCCAAATCTTTCTAAATTTAACCAAGAA
CTTCATCAGTTCACAGAGAAAGTAATCCAGGACCGGAAGGAGTCTCTTAAGGATAAG
CTAAAACAAGATACTACTCAGAAAAGGCGCTGGGATTTTCTGGACATACTTTGAGTG
CCAAAAGCGAAACACCAAAGATTTCTCTGAAGCAGATCTCCAGGCTGAAGTGAAAA

CGTTCATGTTTGCAGGACATGACACCACATCCAGTGCTATCTCCTGGATCCTTTACTG
CTTGCCAAAGTACCCTGAGCATCAGCAGAGATGCCGAGATGAAATCAGGGAACTCCT
AGGGGATGGGTCTTCTATTACCTGGGAACACCTGAGCCAGATGCCTTACACCACGAT
GTGCATCAAGGAATGCCTCCGCCTCTACGCACCGGTAGTAAACATATCCCGGTTACT
CGACAAACCCATCACCTTTCCAGATGGACGCTCCTTACCTGCAGGAATAACTGTGTT
TATCAATG

Transkript 2 CYP4Z1 – SMART A-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

GAAGGGGACAGCAGTGCAGCAAAGCTTGCATATGGGTGTGAGCTGTCATGCACATG
GCTCCTATCTGAAAATCTTGTTCTTCTAGAATCCAGGTAATCAGGTTGTACCAGAGGA
GGAGATGGATGATCAGAGCCCTGCACCTGTTTCCTGCACCCCCCTGCCACTGGTTCT
ATGGCCACAAGGAGATCCCAAAAGTGCTGTTAGCCACAAAATCCTTGAATCCTGGGT
TGGTCGAGGACTTGTGACCCTGGATGGTTCTAAATGGAAAAAGCACCGCCAGATTGT
GAAACCTGGCTTCAACATCAGCATTCTGAAAATATTCATCACCATGATGTCTGAGAGT
GTTTCGGATGATGCTGAACAAATGGGAGGAACACATTGCCCAAACTCACGTCTGGAG
CTCTTTCAACATGTCTCCCTGATGACCCTGGACAGCATCATGAAGTGTGCCTTCAGC
CACCAGGGCAGCATCCAGTTGGACAGTACCCTGGACTCATACCTGAAAGCAGTGTTT
AACCTTAGCAAAATCTCCAACCAGCGCATGAACAATTTTCTACATCACAACGACCTGG
TTTTCAAATTCAGCTCTCAAGGCCAAATCTTTTCTAAATTTAACCAAGAACTTCATCAG
TTCACAGAGAAAGTAATCCAGGACCGGAAGGAGTCTCTTAAGGATAAGCTAAAACAA
GATACTACTCAGAAAAGGCGCTGGGATTTTCTGGACATACTTTTGAGTGCCAAAAGC
GAAAACACCAAAGATTTCTCTGAAGCAGATCTCCAGGCTGAAGTGAAAACGTTTCATG
TTTGCAGGACATGACACCACATCCAGTGCTATCTCCTGGATCCTTTACTGCTTGGCAA
AGTACCCTGAGCATCAGCAGAGATGCCGAGATGAAATCAGGGAACTCCTAGGGGAT
GGGTCTTCTATTACCTGGGAACACCTGAGCCAGATGCCTTACACCACGATGTGCATC
AAGGAATGCCTCCGCCTCTACGCACCGGTAGTAAACATATCCCGGTTACTCGACAAA
CCCATCACCTTTCCAGATGGACGCTCCTTACCTGCAGGAATAACTGTGTTTATCAATG

Transkript 3 CYP4Z1 – SMART C-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

TGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGGCGGGGGGATGGATAGCATTAGGAGA
TATACCTAATGTAAATGACGAGTTAATGGGTGCAGCACACCAACATGGCACATGTAT
ACATATGTAACAAACCTTCATGTTGTGCATATGTACCCTAAACTTAAATATAATTTT
AAAAAAAAAAGTAAAAGAGAAAAAAAAAAAAAGACAGAATCTTCGCTCATGCACTTACCTG
CTTTTCTTCTGTTTACTCAGGAATAACTGTGTTTATCAATG

CYP4Z2P-PCR-Produkt aus Zelllinie L-428 (Sequenz ermittelt mit Hilfe des vorwärts Primers)

GGTCAGGATAGGACCGCCAGATTGTGAAACCTGGCTTCAACATCAGCATTCTGAAAA
TATTCATCACCATGATGTCTAAGAGTGTTTCGGATGATGCTGAACAAATGGGAGGAAC
ACATTGCCCAAACTCACGTCTGGAGCTCTTTCAACATGTCTCCCTGATGACCCTGG

ACAGCATCATGAAGTGTGCCTTCAGCCACCAGGGCAGCATCCAGTTGGACAGTACC
CTGGACTCATACCTGAAAGCAGTGTTCAACCTTAGCAAAATCTCCAACCAGCGCATG
AACAATTTTCTACATCACAACGACCTGGTTTTCAAATTCAGCTCTCAAGGCCAAATCTT
TTCTAAATTTAACCAAGAACTTCATCAGTTCACAGAGAAAGTAATCCAGGACCGGAAG
GAGTCTCTTAAGGATAAGCTAAAACAAGATACTACTCAGAAAGG

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 31. August 2012

A handwritten signature in black ink, reading "Nadine Wappler". The signature is written in a cursive style with a large, stylized 'W'.

Nadine Wappler